



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

El exómero coordina la señalización celular con la homeostasis iónica y lipídica

Esteban Moscoso Romero

Tesis Doctoral

Salamanca, 2024



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



ibfg Instituto de Biología
Funcional y Genómica

Esta tesis doctoral se ha realizado gracias a una beca predoctoral de la Junta de Castilla y León (Orden EDU/556/2019; 2019-2023), a los proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación/ FEDER “Una manera de hacer Europa” (BFU2017-84508-P y PID2020-115111GB-I00 concedidos a H. Valdivieso), y de la Junta de Castilla y León/ Unión Europea, programa FEDER “Escalera de Excelencia” CLU-2017-03/14-20 y al Proyecto de Internacionalización CL-El-2021-08 concedidos al IBFG.

Agradezco a M. Balasubramanian, J. Cansado, J.A. Cooper, M. Gacto, S. Hemmingsen, S. Moreno, P. Pérez, J. Ariño, I. Hagan, D. Hirata, T. Kuno, S. Martin, J. C. Ribas, Y. Sánchez, S. Whitehall y a YGRC (<http://yeast.nig.ac.jp/yeast/>) por las cepas y plásmidos cedidos, y a R. Serrano y C. Roncero por el anticuerpo anti-Pma1.

ABREVIATURAS

AP	<i>Assembly Polypeptides</i>
BRCT	<i>BReast Cancer C-Terminal</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
ChAPs	Proteínas de unión a Chs5 y Arf1 (<i>Chs5 and Arf1-binding Proteins</i>)
CIP	Ruta de integridad celular (<i>Cell Integrity Pathway</i>)
CL	Cardiolipina
DAG	Diacilglicerol
EGFP	Proteína verde fluorescente mejorada (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
EMM	<i>Edinburgh Minimal Medium</i>
ENTH	<i>Epsin N-Terminal Homology</i>
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FN3	<i>Fibronectin type III</i>
GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase-Activating Protein</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de guanina (<i>Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor</i>)
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de guanina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GGA	<i>Golgi-localized Gamma-ear-containing Arf-binding protein</i>
GST	Glutatión S-Transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HygB	Higromicina B
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MAPKK	MAP quinasa quinasa
MAPKKK	MAP quinasa quinasa quinasa
MCS	Sitios de contacto de membranas (<i>Membrane Contact Sites</i>)
MP	Membrana Plasmática
PA	Ácido fosfatídico (<i>Phosphatidic Acid</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PC	Fosfatidilcolina (<i>Phosphatidylcholine</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Fosfatidiletanolamina (<i>Phosphatidylethanolamine</i>)
PI	Fosfoinosítidos (<i>Phosphoinositides</i>)
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfato (<i>Phosphatidylinositol 3-phosphate</i>)
PI(3,5)P2	Fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato (<i>Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate</i>)
PI4P	Fosfatidilinositol 4-fosfato (<i>Phosphatidylinositol 4-phosphate</i>)
PI(4,5)P2	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate</i>)
PKC	Proteína quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)

PL	Fosfolípido (<i>Phospholipid</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
PVE	Endosoma Prevacuolar (<i>Prevacuolar Endosome</i>)
PVDF	Difluoruro de polivinilideno (<i>Polyvinylidene difluoride</i>)
RE	Retículo Endoplasmático
ROI	Región de interés (<i>Region Of Interest</i>)
SAPK	Proteína quinasa de respuesta a estrés (<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>)
SDS	Dodecil Sulfato Sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
TBST	Tampón Tris salino con Tween (<i>Tris-buffered Saline with Tween</i>)
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TGN	Red <i>trans</i> del Golgi (<i>trans-Golgi Network</i>)
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
TPR	<i>TetratricoPeptide Repeats</i>
VIC	Viable en Inmunosupresor y Cloruro
WT	Silvestre (<i>Wild-Type</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast Extract Supplemented</i>)

Las abreviaturas que no se indican siguen el código de la IUPAC.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Las levaduras como organismo modelo	1
2. La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
2.1. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	2
3. El tráfico intracelular de proteínas	4
3.1. Mecanismos de tráfico vesicular	6
3.1.1. GTPasas pequeñas	6
3.1.2. Fosfoinosítidos	7
3.1.3. Proteínas de cubierta y adaptadores	8
3.2. Tráfico mediado por clatrina	8
3.2.1. Clatrina: estructura y función	8
3.2.2. Adaptadores de clatrina	9
3.2.3. Coordinación de los adaptadores de clatrina en el TGN	16
3.3. Tráfico independiente de clatrina	17
3.3.1. El exómero de <i>S. cerevisiae</i>	17
3.3.2. El exómero de <i>S. pombe</i>	21
3.4. Importancia de los lípidos en el tráfico de membranas	21
3.5. El flujo iónico en el sistema endosomal	23
4. Homeostasis iónica en <i>S. pombe</i>	25
4.1. Homeostasis del potasio	25
4.2. Homeostasis del calcio	27
5. Las cascadas de MAPK	29
5.1. La ruta de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	30
5.2. La ruta de integridad celular (CIP) en <i>S. pombe</i>	32
5.2.1. Mecanosensores en <i>S. pombe</i>	35
5.2.2. Las GTPasas Rho en la ruta de integridad	35
5.2.3. Ortólogos de PKC	37

5.2.4. Localización de los componentes de la ruta CIP y su relación con los lípidos	38
6. Los complejos TOR.....	40
6.1. El complejo TORC2 de <i>S. pombe</i>	40
6.2. Relación entre TORC2 y la ruta de integridad.....	41
7. Relación entre el tráfico vesicular y la señalización	42
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	45
RESULTADOS	49
1. El papel del exómero en la homeostasis iónica y la secreción polarizada	49
1.1. Los mutantes del exómero acumulan iones K ⁺	49
1.2. Los mutantes del exómero presentan interacción genética con mutantes en transportadores y canales de K ⁺	50
1.3. Hiperpolarización de la MP en los mutantes del exómero.....	53
1.4. La distribución de la bomba de extrusión de K ⁺ Cta3 es anómala en los mutantes del exómero.....	54
1.5. Regulación de la homeostasis del K ⁺ en el PVE por parte del exómero	59
1.6. Los mutantes del exómero presentan defectos en la homeostasis del Ca ²⁺ y en la distribución de Pkd2	60
1.7. Fenotipo de los mutantes defectuosos en la clasificación de proteínas en el TGN.....	66
2. La distribución de los lípidos de la membrana plasmática está alterada en los mutantes del exómero	67
2.1. Distribución de los esteroides.....	67
2.2. Distribución del PI(4,5)P2	70
3. Relación entre el exómero, los lípidos de la MP y la ruta de integridad celular	72
3.1. Los mutantes del exómero son defectuosos en la activación de la ruta CIP en respuesta a estrés osmótico	72
3.2. El exómero no es un componente de la ruta CIP.....	76
3.3. La distribución de los reguladores de CIP está alterada en los mutantes del exómero expuestos a KCl	78

3.4. En mutantes del exómero el defecto en la activación de CIP correlaciona con defecto en la localización de Pck2	83
3.5. Un aumento en la disponibilidad de PI4P y otros PLs en la MP suprime el defecto en la distribución de Pck2 en ausencia del exómero.....	86
3.6. Lo mutantes del exómero acumulan PI4P en el Golgi	93
3.7. Papel de los adaptadores de clatrina del TGN en la respuesta CIP	95
DISCUSIÓN	101
1. Sensibilidad a K ⁺ en los mutantes del exómero	101
2. El exómero y la secreción polarizada	106
3. El exómero, la ruta de integridad celular y la homeostasis lipídica	108
4. Adaptadores de clatrina en el TGN	111
5. El exómero como elemento regulador	112
CONCLUSIONES	117
MATERIALES Y MÉTODOS	121
1. Microorganismos empleados	121
2. Medios y condiciones de cultivo.....	121
2.1. Medios y condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	122
2.2. Medios y condiciones de cultivo para <i>S. pombe</i>	122
2.3. Medios y condiciones de cultivo especiales para <i>S. pombe</i>	123
2.4. Ensayos de crecimiento en gota	123
3. Conjugación y aislamiento de ascosporas al azar.....	124
4. Procedimiento generales de biología molecular	125
4.1. Vectores utilizados.....	125
4.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	125
4.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	125
4.2. Obtención de DNA	126
4.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	126
4.4. Manipulación general de ADN	127
4.5. Secuenciación	127
4.6. Plásmidos construidos	128

4.7. Detección de genes y marcaje de proteínas en su <i>locus</i>	128
4.8. Transformación de <i>E. coli</i>	128
4.9. Transformación de <i>S. pombe</i>	129
5. Procedimientos generales de bioquímica	129
5.1. Cálculo de la concentración intracelular de potasio.....	129
5.2. Cuantificación de la actividad ATPasa	129
6. Análisis y detección de proteínas	129
6.1. Obtención de extractos proteicos	129
6.1.1.Obtención de extractos proteicos para el análisis de activación de Pmk1 y Sty1.....	130
6.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	131
6.3. Inmunodetección de proteínas.....	131
6.4. Ensayo de interacción proteína-lípido	133
7. Técnicas microscópicas.....	133
7.1. Microscopía de campo claro y contraste de fases.....	133
7.2. Microscopía de fluorescencia	133
7.2.1. Fluorescencia directa con proteínas de fusión	135
7.3. Procesamiento y análisis de las imágenes adquiridas	136
8. Análisis estadístico de los resultados	137
9. Bases de datos y programas bioinformáticos utilizados	138
ANEXO	141
I. Figuras	141
II. Tabla de cepas.....	143
III. Secuencias utilizadas para construir cepas bajo la expresión de genes no nativos	147
BIBLIOGRAFÍA	155

INTRODUCCIÓN

1. Las levaduras como organismo modelo

El término levadura se refiere al conjunto de hongos microscópicos unicelulares. *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* son dos especies de levadura ampliamente empleadas en los estudios de biología molecular y celular. Ambas especies comparten una serie de características que las hacen interesantes como organismos modelo en estos campos de estudio. Entre estas cualidades destacan que crecen fácilmente en medios de cultivos simples, presentan tiempos de generación cortos, se pueden almacenar a largo plazo de forma sencilla y no son patógenos. Además, se pueden manipular genéticamente en el laboratorio con facilidad, lo que permite realizar diferentes análisis genéticos y moleculares. Todo esto, unido a la secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* en 1996 (Goffeau et al., 1996) y de *S. pombe* en 2002 (Wood et al., 2002), explica el uso de estos microorganismos en los laboratorios de investigación.

Estas levaduras, pese a encontrarse evolutivamente distantes de los metazoos, presentan muchos procesos celulares en común con ellos. En este sentido, el estudio de la fisiología celular de las levaduras ha ayudado (y sigue ayudando) a comprender el funcionamiento de las células humanas. Además, la investigación con levaduras también es útil para entender los mecanismos moleculares de diversas enfermedades humanas como el cáncer, procesos degenerativos, enfermedades metabólicas y distintas enfermedades infecciosas. De hecho, un 25% de los genes de humanos causantes de enfermedades tienen su homólogo en levaduras (Bassett et al., 1996).

A pesar de presentar ciertas características compartidas, *S. pombe* y *S. cerevisiae* son dos especies muy alejadas evolutivamente, ya que divergieron de un ancestro común hace entre 330 y 420 millones de años (Sipiczki, 2000). Por tanto, estudiar diferentes procesos celulares en ambos organismos puede aportar información complementaria, además de ayudar a comprender las características conservadas en estos procesos.

2. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

El presente trabajo se ha llevado a cabo utilizando la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Este microorganismo es un hongo unicelular perteneciente a

los ascomicetos. Tiene un genoma de 13,8 Mb que contiene 5064 genes codificantes de proteínas y está repartido en tres cromosomas: I (5,7 Mb), II (4,6 Mb) y III (3,5 Mb; Pombase, <https://www.pombase.org/>).

Esta levadura fue aislada por primera vez por Paul Linder en 1893 de una muestra de cerveza del este de África. A este descubrimiento debe su nombre, ya que *pombe* significa cerveza en suajili. Sin embargo, la mayoría de las estirpes utilizadas en el laboratorio derivan de una cepa aislada en un zumo de uva por A. Osterwalder en 1921. Tiempo después U. Leupold observó que en la muestra de Osterwalder había una cepa homotática (tipo sexual h^{90}) y dos cepas heterotáticas (tipo sexual h^+ y h^-) que provenían de la primera (Leupold, 1949). El hecho de que las cepas usadas actualmente en los laboratorios descendan de estas, hace que se trabaje con cepas prácticamente isogénicas entre los diferentes grupos de investigación. Esto reduce la variabilidad de los resultados obtenidos entre distintos laboratorios con respecto a *S. cerevisiae*, donde existen diferentes fondos genéticos.

2.1. Ciclo de vida de *S. pombe*

La levadura de fisión presenta un ciclo de vida en el que se alternan las fases haploide y diploide en función de una serie de factores ambientales y de la interacción entre células de distinto tipo sexual (**Figura 1**). Las células de esta levadura son haploides en condiciones normales y presentan una morfología cilíndrica que se mantiene a lo largo del ciclo celular. Las células haploides presentan dos tipos sexuales complementarios y excluyentes: h^+ o h^- . Estas células poseen un tamaño de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de largo tras dividirse. A continuación, van creciendo por los polos celulares manteniendo un diámetro constante y aumentando su longitud hasta las 12-15 μm . Cuando alcanzan este tamaño, se forma un septo de división que separa a las células por la mitad, produciendo dos células hijas idénticas en tamaño. Este proceso de división se denomina fisión celular, y por ello *S. pombe* también es conocida como la levadura de fisión. Esta parte de la fase haploide se denomina ciclo celular mitótico o vegetativo y en ella ocurre el aumento poblacional de la levadura. Cuando las condiciones del medio cambian y se agota la fuente de nitrógeno, las células del tipo sexual complementario (h^+ y h^-) entran en contacto, en un proceso conocido como conjugación, y se fusionan formando un cigoto diploide. Este es inestable y su núcleo sufre

una división meiótica, lo cual da lugar a un asca cigótica con cuatro ascosporas haploides en su interior. Cuando el asca está madura se produce su dehiscencia y se liberan las ascosporas. Estas germinan cuando las condiciones del medio vuelven a ser favorables, generando de nuevo células haploides y reiniciándose así el ciclo. Los cigotos diploides se pueden mantener si se inoculan en medio rico antes de que ocurra la meiosis. Esto daría lugar a un ciclo mitótico diploide. Si el medio se empobrece, los diploides esporularían originando un asca acigótica.

Las estirpes h^+ y h^- son heterotálicas, por lo que necesitan un compañero de tipo sexual opuesto para conjugarse. Sin embargo, también existe una estirpe homotálica denominada h^{90} , que es capaz de conjugarse consigo misma. Esto es así porque las células de esta estirpe pueden cambiar de tipo sexual entre h^+ y h^- cada dos generaciones (Leupold, 1958).

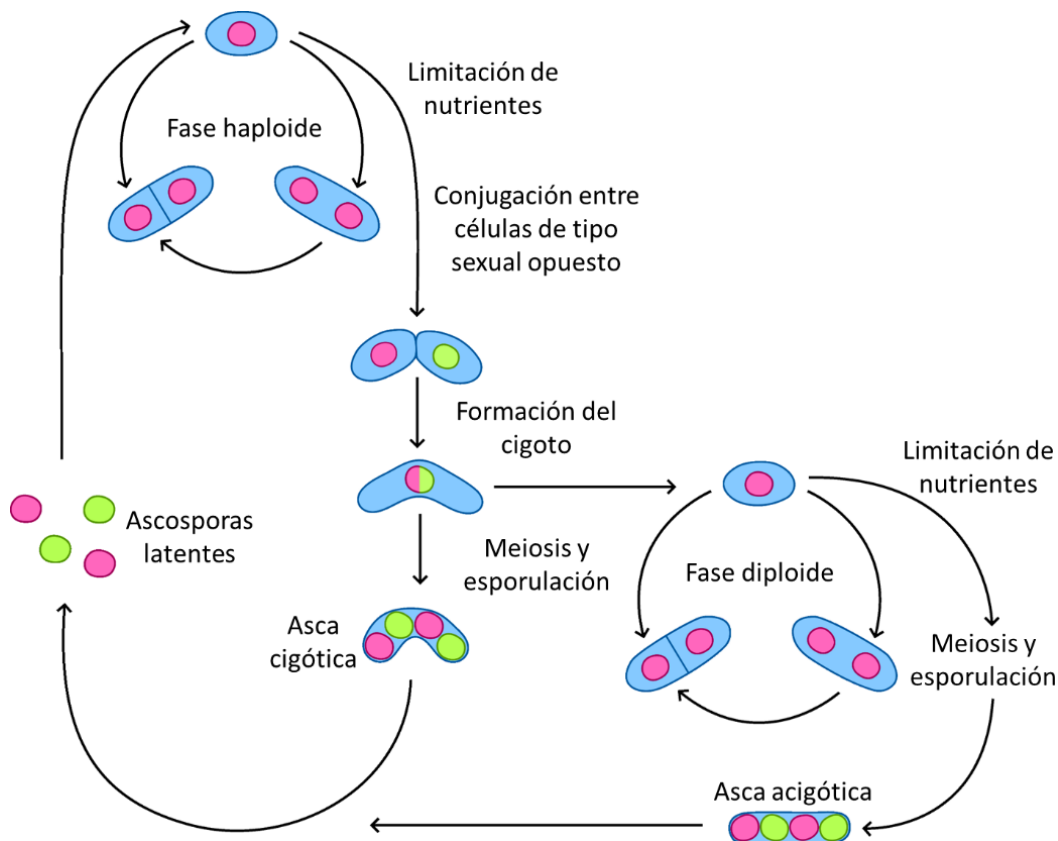


Figura 1. Ciclo de vida de *S. pombe*. Representación de las distintas fases del ciclo de vida de la levadura de fisión. Los colores indican dos tipos sexuales diferentes (h^+ y h^-).

3. El tráfico intracelular de proteínas

La célula eucariota contiene diversos compartimentos membranosos intracelulares u orgánulos. Cada uno de ellos está especializado en la realización de unas funciones determinadas. Sin embargo, los diferentes orgánulos no son estructuras aisladas, sino que existe comunicación entre ellos para integrar las diferentes funciones celulares. Permitir esta comunicación y el intercambio de diferentes elementos (proteínas, lípidos...), es la función principal del tráfico intracelular. Además, este facilita la comunicación de la célula con el medio exterior mediante procesos como la secreción o la endocitosis. Las rutas secretora y endocítica están compuestas por compartimentos membranosos que se comunican a través de la generación, movimiento y fusión de vesículas con cubiertas (Behnia and Munro, 2005; Palade, 1975; Shikano and Colley, 2013). El tráfico vesicular permite el transporte de *cargos* solubles y componentes de membrana entre compartimentos, contribuyendo al mantenimiento de su composición proteica y lipídica. En estos procesos participa la membrana plasmática (MP) y el sistema de endomembranas, que está formado por una serie de compartimentos intercomunicados. Estos son el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi, los endosomas y los lisosomas en mamíferos o las vacuolas en plantas y levaduras (**Figura 2**).

Las proteínas son uno de los elementos a transportar o *cargos* más importantes. Estas tienen que ser llevadas desde el lugar en el que se sintetizan hasta el lugar donde realizan su función. Las proteínas solubles en el citoplasma pueden alcanzar la membrana de un determinado orgánulo uniéndose a una proteína y/o a un lípido presente en él. Sin embargo, las proteínas transmembrana y las proteínas solubles del lumen de los orgánulos necesitan mecanismos especializados para transportarse. Estas proteínas se sintetizan en el RE, donde tiene lugar un complejo proceso de plegamiento y ensamblaje. Posteriormente son transportadas hacia el aparato de Golgi, desde donde se distribuyen hacia otros compartimentos celulares. El Golgi juega un papel fundamental en el tráfico vesicular. En particular, la red *trans* del Golgi (TGN, *trans*-Golgi Network) y los endosomas tempranos, que en levadura se pueden considerar compartimentos equivalentes (Day et al., 2018), sirven como centros de clasificación que conectan las rutas secretora y endocítica. De esta

forma, se pueden enviar proteínas y lípidos a la MP, al sistema endosomal prevacuolar tardío (PVE) o directamente a las vacuolas/lisosomas. Además, todas estas rutas son bidireccionales, por lo que el TGN puede recibir también material celular de todos estos compartimentos. Este transporte requiere la participación de una serie de proteínas denominadas cubiertas y adaptadores (Anitei and Hoflack, 2011; Barlowe and Miller, 2013; Boehm and Bonifacino, 2001; Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; De Matteis and Luini, 2008; Hirst and Robinson, 1998; Lemmon and Traub, 2000; Park and Guo, 2014; Tan and Gleeson, 2019).

El tráfico intracelular es un proceso complejo que tiene que suceder de manera regulada y coordinada. La alteración de este proceso a distintos niveles es la base de una gran variedad de enfermedades humanas como algunos tipos de cáncer, ciertos procesos neurodegenerativos y algunas patologías metabólicas (Abubakar et al., 2017; Howell et al., 2006; Leto and Saltiel, 2012; Tzeng and Wang, 2016; Wang et al., 2014). En este sentido, los estudios realizados en levaduras han permitido la identificación de gran parte de los efectores, los complejos proteicos y las rutas de tráfico presentes en las células eucariotas, la mayor parte de los cuales se encuentran conservados en metazoos (Feyder et al., 2015).

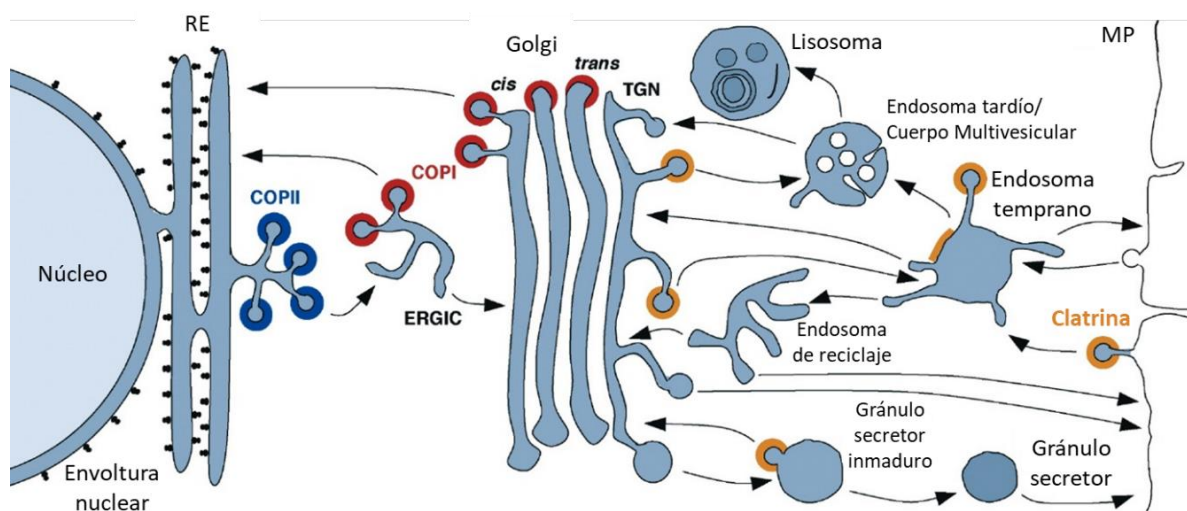


Figura 2. Las rutas de tráfico intracelular. Esquema del tráfico entre los distintos compartimentos del sistema celular de endomembranas en una célula eucariota modelo. Las flechas representan las etapas de transporte de *cargo* entre compartimentos, mediadas por vesículas o prolongaciones tubulares membranosas. La ruta secretora y la endocítica están interconectadas a través del TGN, compartimento que recibe, clasifica y envía el *cargo* al destino subcelular correspondiente. Adaptado de Bonifacino y Glick, 2004.

3.1. Mecanismos de tráfico vesicular

La teoría del transporte vesicular de proteínas fue propuesta por George Palade en 1975, basándose principalmente en estudios de microscopía electrónica. En ella se postula que el tráfico de proteínas entre los distintos orgánulos celulares se produce a través de vesículas que geman desde un compartimento membranoso donador y son transportadas hasta un compartimento receptor (Palade, 1975). Posteriormente, gracias al trabajo de numerosos grupos de investigación, se ha conseguido profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que facilitan el tráfico vesicular. De forma resumida este proceso consta de los siguientes pasos: formación y escisión de la vesícula en el compartimento donador, transporte de la misma a través de la célula, desensamblaje de la cubierta, anclaje a la membrana del compartimento de destino y fusión con el mismo. Todos estos pasos están muy regulados para asegurar que las proteínas lleguen a su destino correcto. La formación de la vesícula comienza por una acumulación de ciertos elementos en una zona concreta de la membrana del orgánulo donador. Así, el material lipídico y proteico a transportar se va agrupando en esas zonas. Aunque se desconoce el mecanismo preciso que inicia el proceso, se sabe que las GTPasas y ciertos lípidos como los fosfoinosítidos juegan un papel importante, confiriendo de identidad a las membranas. A continuación se va a hablar con más detalle de algunos de los componentes que participan en el tráfico vesicular.

3.1.1. GTPasas pequeñas

Las proteínas G monoméricas o GTPasas pequeñas son enzimas que catalizan la hidrólisis del guanosín trifosfato (GTP) para generar guanosín difosfato (GDP) y P_i . Pertenecen a la superfamilia de proteínas Ras y son reguladores esenciales del tráfico vesicular. Estas proteínas son interruptores moleculares y su estado de activación depende de la unión a nucleótidos de guanina. Si están unidas a GTP, se encuentran en estado activo y asociadas a la membrana. Esto facilita la posterior interacción con diferentes efectores presentes en ella y el reclutamiento de otras proteínas que participan en tráfico, como los adaptadores y las cubiertas. La capacidad inherente de estas proteínas para la hidrólisis de GTP a GDP promueve su inactivación y liberación al citosol. Los GAPs (*GTPase-Activating Proteins*)

promueven esta hidrólisis de GTP a GDP mientras que los GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factors*) catalizan el intercambio de GDP por GTP (Revisado por García y Vicente-Soler; García et al., 2022 y Vicente-Soler et al., 2021). Además, en algunas GTPasas que llevan unidos grupos farnesilo o geranilgeranilo en su extremo C-terminal, las GDIs (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) secuestran su forma unida a GDP en el citosol para evitar su activación por GEFs y su unión a la membrana (Cherfils and Zeghouf, 2013). Diferentes GTPasas participan en distintos pasos y rutas de tráfico, aportando especificidad al sistema.

3.1.2. Fosfoinosítidos

Los lípidos tienen un papel importante en el proceso de vesiculación. Algunos son importantes para conferir curvatura a la membrana. Los fosfoinosítidos específicamente facilitan el reclutamiento y/o la activación de proteínas efectoras como las GTPasas o los adaptadores de clatrina (De Craene et al., 2017). Los fosfoinosítidos están formados por una molécula de inositol unida por un fosfato a una de diacilglicerol. Este lípido se puede fosforilar en diferentes posiciones dentro de la molécula de inositol, dando lugar a distintos fosfoinosítidos. Cada uno de ellos predomina en un orgánulo determinado y es capaz de unir diferentes efectores, lo que confiere identidad a las membranas (De Craene et al., 2017). Así, en el aparato de Golgi predomina el fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) cuyo gradiente de concentración permite el reclutamiento gradual de diferentes adaptadores de clatrina en el TGN (Daboussi et al., 2012). En la MP hay PI4P, aunque predomina el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂], que facilita la unión del complejo adaptador de clatrina AP-2 (Collins et al., 2002; Gaidarov and Keen, 1999; Rohde et al., 2002). En los endosomas tempranos de mamíferos o en el endosoma prevacuolar de levaduras predomina el fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), que posibilita la unión del complejo ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) y del retrómero a estos compartimentos (Raiborg, 2001; Stahelin et al., 2002; Yu and Lemmon, 2001). Por último, en los lisosomas de mamíferos o vacuolas de levaduras predomina el fosfatidilinositol 3,5-bisfosfato [PI(3,5)P₂], que es importante para la unión de una subunidad del ESCRT en mamíferos y de las epsinas Ent3 y Ent5 en levaduras (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003; Whitley et al., 2003).

3.1.3. Proteínas de cubierta y adaptadores

En la mayoría de ocasiones la formación de las vesículas de transporte está mediada por proteínas “de cubierta”, que son proteínas solubles presentes en el citoplasma. Al unirse a la membrana, estas proteínas promueven su curvatura, facilitando el proceso de vesiculación. Además, reconocen a los *cargos* de manera directa o indirecta a través de adaptadores solubles y/o receptores transmembrana. De esta forma participan en el proceso de selección y agrupación de los *cargos*. El reclutamiento de las proteínas de la cubierta a las membranas está mediado por su interacción, directa o indirecta, con distintos elementos como los *cargos*, los lípidos y las GTPasas (Bonifacino and Glick, 2004; Paczkowski et al., 2015). Hay distintas proteínas de cubierta y adaptadoras que participan en diferentes rutas de tráfico. A continuación, se habla con más detalle de cada una de ellas.

3.2. Tráfico mediado por clatrina

3.2.1. Clatrina: estructura y función

La clatrina necesita la unión de un complejo adaptador para formar la cubierta vesicular. Este tipo de cubiertas participan en el tráfico desde el TGN/endosomas tempranos hacia la MP o hacia el PVE o las vacuolas, y desde la MP hacia el interior celular (en el caso de la endocitosis). Existen diferentes proteínas adaptadoras que se asocian con clatrina y participan en diferentes rutas de tráfico (**figura 3A**). Estos adaptadores pueden actuar en forma de complejos proteicos, como los adaptadores AP, o pueden ser monoméricos, como los GGAs y las epsinas (Boehm and Bonifacino, 2001; Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Lafer, 2002).

La unidad estructural o de ensamblaje de la clatrina se denomina trisquelión. Está compuesto por un trímero de cadenas pesadas de clatrina (Chc1) unidas por su extremo C-terminal de forma radial, a las que se unen tres cadenas ligeras (Clc1) de forma paralela (**Figura 3B, panel superior**; Kirchhausen and Harrison, 1981; Ungewickell and Branton, 1981). Para formar una vesícula se ensamblan en la membrana aproximadamente 36 trisqueliones, dando lugar a una estructura poliédrica con caras hexagonales y pentagonales

que constituye un enrejado de clatrina alrededor de la membrana de la vesícula (**Figura 3B, panel inferior**).

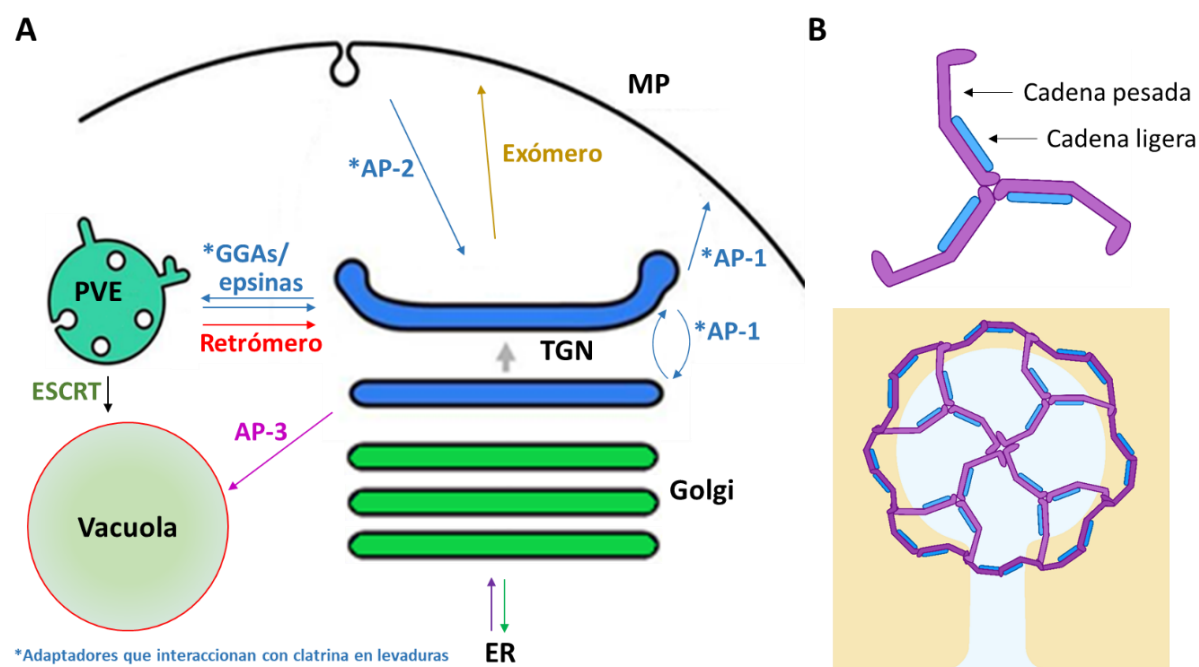


Figura 3. Cubiertas y adaptadores en el tráfico vesicular de levaduras. (A) Esquema resumen con las distintas rutas del tráfico a partir del TGN, y las cubiertas y adaptadores implicados en ellas. RE, retículo endoplasmático; TGN, red trans del Golgi; MP, MP; PVE, endosoma prevacuolar. Adaptado de Day et al., 2018. **(B)** Panel superior, representación de la estructura de un trisquelión. Panel inferior, organización de la cubierta de clatrina. Adaptado de *Mechanobiology Institute (MBI), University of Singapore*.

3.2.2. Adaptadores de clatrina

La clatrina carece de dominios de unión a las membranas, por lo que necesita interactuar en el TGN con otras proteínas denominadas adaptadores (complejos AP, GGAs y epsinas entre otros), que facilitan su reclutamiento para recubrir vesículas destinadas a la MP o a las vacuolas (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Buser and Spang, 2023; Hirst and Robinson, 1998; Tan and Gleeson, 2019). Estos adaptadores se asocian a la membrana mediante la interacción con las GTPasas, los fosfoinosítidos y los *cargos*, aunque estas interacciones varían dependiendo del adaptador. Los adaptadores difieren entre sí tanto en su estructura (**Figura 4**) como en las distintas rutas de tráfico en las que intervienen (**Figura 3**).

Complejos adaptadores (APs)

Los complejos adaptadores de tipo AP (*Assembly Polypeptides*) son complejos solubles citosólicos que tienen un papel crucial en la selección de *cargo* y la formación de vesículas. Reconocen e interactúan específicamente con secuencias de los dominios citoplasmáticos de proteínas *cargo* transmembrana, y reclutan a la clatrina y a otras proteínas accesorias para el empaquetamiento de los *cargos* seleccionados en vesículas secretoras (Park and Guo, 2014).

En mamíferos se conocen hasta el momento cinco complejos adaptadores AP denominados AP-1 a AP-5. Evolutivamente AP-5 fue el primero en divergir, seguido de AP-3 y AP-4, mientras que AP-1 y AP-2 son los más íntimamente relacionados (Dacks and Robinson, 2017; Hirst et al., 2014). Estos complejos se asocian a la MP, al TGN y a los endosomas, mediando el tráfico entre estos compartimentos. De estos complejos sólo AP-1, AP-2 y AP-3 interaccionan con clatrina, mientras que AP-4 y AP-5 ejercen su función sin unirse a ella. En levaduras solamente se han descrito tres complejos pertenecientes a esta familia, AP-1, AP-2 y AP-3 (Boehm and Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2013; Park and Guo, 2014). En *S. cerevisiae* se ha descrito interacción física de la clatrina con el adaptador AP-1, pero no con los otros dos adaptadores (Lemmon and Traub, 2000; Yeung et al., 1999). En *S. pombe* por el momento sólo se ha detectado interacción física de clatrina con AP-2 (de León et al., 2016).

El complejo AP-1 participa en el tráfico bidireccional entre el TGN y la MP, ejerciendo una función que está conservada desde levaduras hasta mamíferos (Anton-Plagaro et al., 2021; Buser et al., 2018; Robinson et al., 2010; Valdivia et al., 2002). En los últimos años varios estudios han revelado una función de AP-1 en la secreción polarizada de proteínas hacia la MP. En *Arabidopsis thaliana*, AP-1 puede verse mediante microscopía en vesículas secretoras saliendo del TGN (Shimizu et al., 2021), y además es necesario para la secreción polarizada en *Candida albicans* y *Aspergillus nidulans* y para la localización apical de proteínas en células epiteliales (revisado por Duncan; Duncan, 2022). En mamíferos, AP-1 se recluta a la membrana del TGN y endosomas mediante su interacción con la GTPasa Arf1

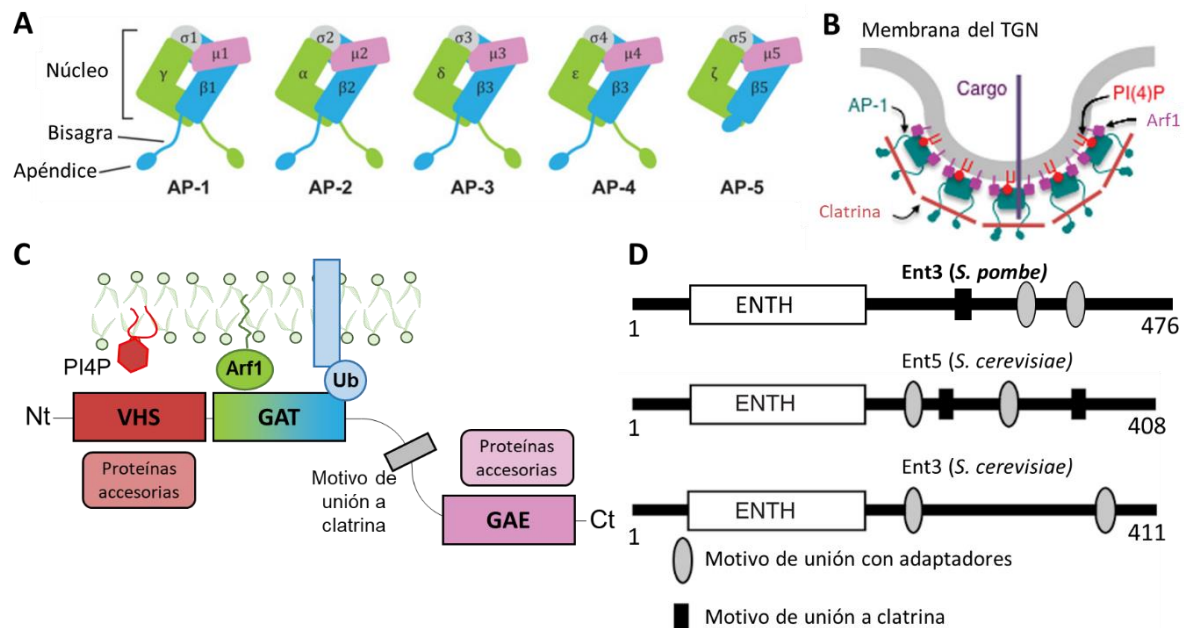
(que favorece el cambio conformacional del complejo de una forma cerrada a una forma abierta), con el PI4P y con el *cargo* (**Figura 4B**; Ren et al., 2013; Wang et al., 2003). En estos organismos, el complejo AP-1 participa en el transporte del receptor de la manosa 6-fosfato (MPR) entre el TGN y endosomas. También está implicado en el transporte de diferentes proteínas de membrana desde el aparato de Golgi o los endosomas hasta la MP basolateral de las células epiteliales (Boehm and Bonifacino, 2001; Bonifacino, 2014).

En *S. cerevisiae*, diferentes mutaciones en los componentes del complejo AP-1 producen letalidad sintética con mutaciones en el gen *CHC1* y producen pequeños defectos en el procesamiento de la feromona factor α (Phan et al., 1994). Además, AP-1 es necesario para el reciclaje o retención de distintas proteínas dentro del TGN, como las proteasas Kex2 y Ste13 (Foote and Nothwehr, 2006; Ha et al., 2003), la SNARE Tlg1 (Yeung and Payne, 2001), la enzima quitina sintasa Chs3 (Valdivia et al., 2002), la permeasa general de aminoácidos Gap1 (O'Donnell et al., 2010), la proteína necesaria en el proceso de conjugación Fus1 (Barfield et al., 2009), la proteína priónica Pin2 (Ritz et al., 2014) y la translocasa de fosfolípidos (PL) Drs2 (Liu et al., 2008). En ausencia de algunos de los componentes del complejo AP-1, estas proteínas aparecen deslocalizadas en la MP o en la vacuola en lugar de ser retenidas de forma eficiente en el TGN.

En *S. pombe* la ausencia de alguna de las subunidades del complejo AP-1 provoca fenotipos más severos que en *S. cerevisiae*. Los fenotipos observados son sensibilidad térmica, defectos en citocinesis y alteraciones en la integridad de la pared celular, en la fusión de vacuolas, en la secreción de diversas enzimas y en la morfología del aparato de Golgi (Kita et al., 2004). En los mutantes de las subunidades del complejo AP-1 se deslocalizan algunas proteínas como la SNARE Syb1, la enzima $\beta(1,3)$ -glucano sintasa Bgs1 y la GTPasa Rho3, disminuyendo su localización en los sitios de secreción polarizada y quedando parcialmente retenidas en el TGN. Esto resalta la importancia que tiene el complejo AP-1 en el tráfico vesicular desde esta estructura (Kita et al., 2004, 2011; Ma et al., 2009; Yu et al., 2012, 2013).

El complejo AP-2 participa en la endocitosis, actuando entre la MP y el PVE. A diferencia de AP-1, la unión con el PI(4,5)P2 es suficiente para favorecer el cambio conformacional necesario para la unión con las proteínas *cargo*.

El complejo AP-3 también se localiza en el TGN y endosomas, aunque lo hace en compartimentos diferentes a los que contienen AP-1 (Peden et al., 2004; Theos et al., 2005). Se recluta a las membranas de forma dependiente de Arf1 y participa en el transporte directo desde el TGN a las vacuolas (Boehm and Bonifacino, 2001).



Adaptadores GGAs

Los GGAs (*Golgi-localized, Gamma-ear-containing, Arf-binding proteins*) son adaptadores de clatrina monoméricos que se identificaron inicialmente en base a su similitud con la secuencia del dominio apéndice del complejo AP-1. Participan en el tráfico desde el TGN al PVE/endosoma tardío, aunque también se ha descrito su papel en la retención de proteínas

en el TGN (Doray et al., 2021) y en el tráfico retrógrado desde el PVE (Buser et al., 2022; Buser and Spang, 2023; Yanguas et al., 2019). En mamíferos existen tres GGAs denominados *GGA1*, *GGA2* y *GGA3*. En *S. cerevisiae* están conservados dos de estos adaptadores, *GGA1* y *GGA2*, y en *S. pombe* también existen dos, denominados *gga21+* y *gga22+* por presentar mayor similitud con el gen *GGA2* de *S. cerevisiae* (Bonifacino and Glick, 2004).

El dominio VHS en mamíferos es el responsable de unirse al *cargo* mediante el reconocimiento de motivos acídicos dileucina en las partes citosólicas de los mismos (Misra et al., 2002). En levaduras, este dominio presenta una función diferente, siendo importante para la localización del adaptador, ya que facilita la interacción con el PI4P presente en el TGN y con otras proteínas accesorias (Daboussi et al., 2017; Demmel et al., 2008; Singer-Krüger et al., 2008). El dominio GAT presenta un sitio de unión a la GTPasa Arf1, importante para el reclutamiento de los GGAs al TGN (Dell'Angelica, 2000; Puertollano et al., 2001). Además, este dominio contiene otro sitio por el que reconoce *cargos* ubiquitinados (Scott et al., 2004; Shiba et al., 2004). El dominio GAE, que presenta similitud con el dominio apéndice de la subunidad γ del complejo AP-1, permite la unión con otras proteínas accesorias como γ -sinergina, p56 y epsinR en mamíferos y Ent3 y Ent5 en levaduras (Duncan et al., 2003; Lui et al., 2003; Page et al., 1999).

En mamíferos, las proteínas GGAs se localizan en el TGN y los endosomas (Uemura et al., 2018; Uemura and Waguri, 2020) y son esenciales para el transporte de diferentes hidrolasas y de sus receptores hacia los lisosomas. También participan en el reciclaje de algunas proteínas hacia la MP (Sahgal et al., 2019). Además, muestran una relación funcional con el complejo AP-1 en el transporte entre el TGN y los endosomas tempranos (Doray et al., 2002; Hirst et al., 2012). Esta relación no está clara porque AP-1 y GGAs parecen tener funciones colaborativas en el tráfico anterógrado desde el TGN, pero funciones distintas en la organización de los endosomas (Tan and Gleeson, 2019).

En *S. cerevisiae* la delección conjunta de *GGA1* y *GGA2* produce alteraciones en el tráfico de algunas proteasas vacuolares como la proteína soluble carboxipeptidasa γ (Cpy1) y la carboxipeptidasa S (Cps1), que es una proteína transmembrana (Costaguta et al., 2001; Dell'Angelica, 2000; Hirst et al., 2000; Zhdankina et al., 2001). También se han visto defectos

en el tráfico hacia el PVE de la SNARE Pep12, de la proteasa Kex2 y de Ego1 (subunidad del complejo EGO/GSE regulador de TORC1) en estos mutantes (Black and Pelham, 2000; Costaguta et al., 2001; De et al., 2013; Hatakeyama et al., 2019). Además, los GGAs regulan el tráfico hacia la vacuola de proteínas ubiquitinadas como Gap1, Sit1, Fur4 y Arn1 (Bilodeau et al., 2004; Deng et al., 2009; Erpapazoglou et al., 2008; Scott et al., 2004). Los resultados de todos estos estudios indican que los GGAs son importantes para el tráfico desde el TGN hacia el PVE y la vacuola. Sin embargo, la zona de actuación de estos adaptadores podría ser más amplia debido a que presentan interacción física con otras proteínas implicadas en el transporte dentro del propio TGN, como AP-1, Ent3 y Ent5 (Anton-Plagaro et al., 2021; Costaguta et al., 2001; Duncan et al., 2003). En consonancia con esto, los GGAs están implicados en la retención de la quitina sintasa Chs3 en el TGN y en el reciclaje de la SNARE Snc1 hacia la MP (Black and Pelham, 2000; Čopić et al., 2007).

Adaptadores de tipo epsina

Las epsinas son otra clase de adaptadores monoméricos de clatrina. Estructuralmente se caracterizan por poseer un dominio ENTH (*Epsin N-Terminal Homology*) en su zona N-terminal (**Figura 4D**). A través de este dominio pueden interactuar con fosfatidilinositoles y con los *cargos*. Además, las epsinas suelen tener zonas de unión a clatrina fuera de este dominio. Algunas de estas proteínas pueden tener también zonas de interacción con ubiquitina (Duncan et al., 2003; Friant et al., 2003; Mills et al., 2003). Dependiendo del organismo existen distintas epsinas que pueden participar en el proceso de endocitosis o en el tráfico desde el TGN y los endosomas. A continuación, se van a describir con más detalle las epsinas implicadas en este último proceso.

En mamíferos se ha determinado que epsinR es importante para el correcto tráfico de ciertas SNAREs entre el TGN, los endosomas y los lisosomas (Chidambaram et al., 2004; Hirst et al., 2004). El dominio ENTH de epsinR es necesario para la interacción con los *cargos* y con el PI4P presente en el TGN, y su inserción en la membrana, de forma dependiente de Arf1, favorece la deformación de la misma (Hirst et al., 2003; Mills et al., 2003). Además, esta proteína interacciona con otros adaptadores de clatrina como AP-1 y GGAs (Mills et al., 2003).

En *S. cerevisiae* hay cinco proteínas de tipo epsina. Ent1 y Ent2 participan en el proceso de endocitosis (Reider and Wendland, 2011). Ent3 y Ent5 participan en el tráfico desde el TGN y el PVE. Está descrito que facilitan el transporte de algunas SNAREs que participan en el tráfico entre TGN, PVE y vacuola, como Vti1, Pep12 y Syn8 (Black and Pelham, 2000; Chidambaram et al., 2004; Zimmermann et al., 2010). Además, participan en el transporte de las proteasas vacuolares Cpy1, Cps1 y Phm5 hacia la vacuola (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003). También son necesarias para el correcto tráfico hacia la vacuola de proteínas ubiquitinadas como Arn1 (Deng et al., 2009). Además de participar en el tráfico anterógrado hacia el PVE y la vacuola, también participan en la retención de Chs3 en el TGN y en el reciclaje de la SNARE Snc1 y de la caseína quinasa Yck2 hacia la MP (Black and Pelham, 2000; Čopič et al., 2007; Zimmermann et al., 2010). Aunque en los mutantes sencillos *ent3Δ* y *ent5Δ* se produce algún fenotipo específico, en general es necesario deletar ambos genes para observar defectos en el tráfico de proteínas, indicando que poseen funciones parcialmente redundantes.

Las epsinas interactúan con las proteínas *cargo*, con otras proteínas adaptadoras y con la clatrina para facilitar el transporte. En este sentido Ent3 y Ent5 presentan una relación compleja con las otras proteínas adaptadoras y con la clatrina. Ent3 y Ent5 interactúan con Gga2 en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, Ent5 interactúa con AP-1 y con clatrina en ambos tipos de ensayos, lo cual está de acuerdo con que sólo esta última epsina presenta los motivos consenso de interacción con la cubierta (**Figura 4D**; Duncan et al., 2003). Sin embargo, también se ha visto por inmunoprecipitación interacción de Ent3 con clatrina, aunque podría ser indirecta a través de Gga2 (Friant et al., 2003). La interacción de las epsinas con los dominios “oreja” de los adaptadores Gga2 y AP-1 se produce a través de motivos acídicos con fenilalanina. Tanto Ent3 como Ent5 poseen dos de estos motivos (**Figura 4D**; Duncan et al., 2003).

Ambas epsinas presentan diferencias en cuanto a su reclutamiento a la membrana y a su localización. En este sentido, Ent3 depende de los GGAs para su localización, mientras que Ent5 no. En consonancia con esto, Ent3 colocaliza más con Gga2 que con AP-1, mientras que Ent5 colocaliza por igual con estos dos adaptadores. Además, se ha observado que

existe una mayor interacción génica de *ENT3* con las subunidades del complejo AP-1 que de *ENT5* con este complejo. Por todo esto se ha propuesto que Ent3 actuaría principalmente con los GGAs, mientras que Ent5 actuaría tanto con AP-1 como con los GGAs, siendo más importante para el tráfico mediado por AP-1 (Costaguta et al., 2006). De hecho, la inactivación en mamíferos de epsinR y de AP-1 causan efectos opuestos en el transporte de proteínas al TGN (Buser et al., 2022). Además de estas interacciones, se ha observado que Ent3 y Ent5 se unen al PI(3,5)P2 en el PVE y a la subunidad del ESCRT Vps27 a través de su dominio ENTH. En este sentido, se ha visto que son importantes para la internalización de proteínas ubiquitinadas en el PVE (Eugster et al., 2004; Friant et al., 2003).

Además de las epsinas anteriores, en *S. cerevisiae* existe otra epsina poco caracterizada denominada Ent4. Se sabe que es importante para el tráfico del transportador de ferricromo Arn1 desde el TGN hacia la vacuola (Deng et al., 2009) y que el mutante doble *ent3Δ ent4Δ* presenta defectos en la maduración de Cpy1 (Chidambaram et al., 2004).

En *S. pombe* sólo hay dos epsinas. Por un lado, Ent1 participa en endocitosis (Sakamoto et al., 2004) y no tiene relevancia en esta tesis doctoral. Por otro lado, Ent3 es la homóloga a Ent3 de *S. cerevisiae* y participa en el tráfico de *cargos* de la ruta CPY. Por ejemplo, está involucrada en el tráfico anterógrado y retrógrado de Vps10 entre el TGN y el PVE (colaborando con Gga21 y Gga22), en la salida de Cps1 del TGN hacia la vacuola, o en el reciclaje de Syb1/Snc1 hacia la MP (Yanguas et al., 2019). Estructuralmente posee un dominio ENTH en su zona N-terminal y dos motivos acídicos con fenilalanina que podrían ser importantes para la interacción con otros adaptadores (**Figura 4D**; Duncan et al., 2003). Además, en su secuencia hay un posible motivo de unión a clatrina.

3.2.3. Coordinación de los adaptadores de clatrina en el TGN

Como se ha expuesto en los apartados anteriores, existen diversos adaptadores de clatrina que actúan en el TGN. Por ello debe existir una coordinación entre todos ellos para que se produzca una salida correcta de los *cargos* hacia otros compartimentos celulares. En este sentido, mediante estudios de microscopía en los que se ha analizado la colocalización y dinámica de estas proteínas, se ha observado que existe una regulación temporal de los

adaptadores en el TGN (Daboussi et al., 2012). Así, se ha propuesto un modelo en el que primero se uniría a la membrana del TGN la GTPasa Arf1 y pequeños niveles de la quinasa Pik1, que se encarga de la síntesis de PI4P. La unión de Gga2 a Arf1 y al PI4P permitiría su reclutamiento al TGN, lo cual a su vez propiciaría el reclutamiento de Ent3 y facilitaría la unión a la membrana de más cantidad de Pik1. Esto aumentaría los niveles locales de PI4P y permitiría el reclutamiento de más Gga2. La cantidad cada vez mayor de estos adaptadores hace que se reclute la clatrina y que se produzca una primera ola de transporte. Una vez se alcanzan unos niveles determinados de PI4P se produce el reclutamiento de AP-1 al TGN para producir una segunda ola de transporte. De esta forma, el aumento progresivo en los niveles de PI4P permite el reclutamiento secuencial de estos adaptadores. Ent5 se recluta en bajos niveles durante la primera ola de transporte y sus niveles alcanzan un máximo durante la segunda (Daboussi et al., 2012, 2017). Además, se han descrito numerosas interacciones físicas y funcionales entre AP-1, los GGAs y las epsinas (Anton-Plagaro et al., 2021; Buser and Spang, 2023; Costaguta et al., 2001; Hirst et al., 2001, 2012; Hung et al., 2012).

3.3. Tráfico independiente de clatrina

Existen varios complejos que median el transporte independiente de clatrina: el exómero participa en el transporte desde el TGN hacia la MP, el retrómero transporta proteínas desde el endosoma prevacuolar hasta el TGN y el retriever participa en el reciclaje desde el PVE hacia la MP. En esta tesis doctoral nos centraremos únicamente en el exómero.

3.3.1. El exómero en *S. cerevisiae*

El exómero es un complejo proteico con características intermedias entre adaptador y cubierta, requerido para el transporte desde el TGN hacia la MP de una forma polarizada y descrito por primera vez en *S. cerevisiae* (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Estructuralmente es un heterotetrámero compuesto por dos copias de la proteína Chs5, que forma un andamio proteico al que se unen otras dos proteínas cualesquiera de la familia de las ChAPs (Chs5 and Arf1-binding Proteins), que incluye a Chs6, Bud7, Bch1 y Bch2 (**Figura 5A**; Paczkowski et al., 2012). Este complejo se

localiza en el TGN y depende de la interacción con la GTPasa Arf1 para su asociación a la membrana (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Esta interacción se produce tanto a través de Chs5 como de las ChAPs (**Figura 5B**; Paczkowski et al., 2012).

Chs5 contiene en su zona N-terminal dos motivos, FN3 (*FibroNectin type III*) y BRCT (*BREast Cancer C-Terminal*), que constituyen el módulo FBE, necesario y suficiente para que la proteína se localice en el TGN y lleve a cabo su función (Martín-García et al., 2011; Paczkowski et al., 2012). La presencia de estos motivos es llamativa, puesto que el motivo FN3 es característico de proteínas de la matriz extracelular y no es habitual encontrarlo en levaduras (Bateman and Chothia, 1996), mientras que el motivo BRCT se encuentra en proteínas nucleares participando en procesos de respuesta a daño en el ADN (Huyton et al., 2000). Chs5 tiene siempre una función estructural dentro del complejo, y media el reclutamiento a la membrana de las ChAPs, que serían las encargadas de reconocer al *cargo* (Paczkowski and Fromme, 2014; Rockenbauch et al., 2012; Sanchatjate and Schekman, 2006).

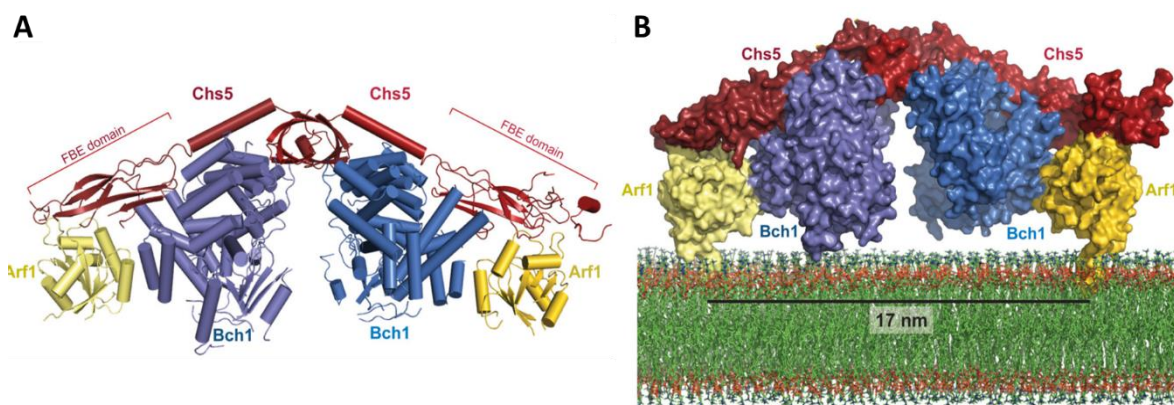


Figura 5. Estructura del exómero. Modelo estructural del exómero (Chs5 y Bch1) en la membrana del TGN interaccionando con dos moléculas de Arf1. Adaptado de Paczkowski y Fromme, 2014.

Las ChAPs poseen una estructura con cinco dominios denominados TPR (*Tetratricopeptide Repeats*), que son necesarios para interacciones proteína-proteína (Blatch and Lässle, 1999; Zhang et al., 2010). Los dominios TPR1-4 son necesarios para la interacción con Chs5 y con el resto de las ChAPs, y también para la localización en el Golgi, mientras que el TPR5 es necesario para el reclutamiento eficiente de las ChAPs en el TGN (Rockenbauch et al., 2012).

Se ha descrito que las ChAPs Bch1 y Bud7 cooperan con la GTPasa Arf1 para facilitar la formación de curvatura en la membrana. Además, Bch1 ayuda a estabilizar al complejo en la membrana. Por su parte Chs6 y Bch2 tendrían un papel más relevante en el reconocimiento de los *cargos* (Huranova et al., 2016; Paczkowski and Fromme, 2014). Por tanto, distintas ChAPs tendrían funciones diferentes dentro del complejo.

Los *cargos* del exómero son proteínas integrales de membrana que se localizan en la MP de los sitios de crecimiento polarizado (el cuello madre-hija, las yemas pequeñas y la punta del shmoo). En *S. cerevisiae* el *cargo* del exómero mejor caracterizado es la quitina sintasa Chs3, aunque también promueve el transporte a las zonas de crecimiento polarizado (en la levadura de gemación, la yema incipiente, la zona del cuello en citoquinesis y la punta del shmoo en conjugación) de la proteína relacionada con la fusión celular durante la conjugación, Fus1 (Barfield et al., 2009) y de Pin2 (proteína con un dominio priónico que interacciona con varios componentes de la ruta de integridad y cuya endocitosis se ve alterada si se interfiere en la señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) Hog1 y Slt2 ; Ritz et al., 2014; Schlecht et al., 2012; Tarassov et al., 2008). Finalmente, se ha descrito que el exómero promueve el transporte polarizado de la bomba de sodio Ena1 (Anton et al., 2017) y de las permeasas de aminoácidos Tat2 y Mup1 (Anton-Plagaro et al., 2021) de la levadura de gemación, y de la quitina sintasa Chs3 de *Candida albicans* (Anton et al., 2018). Todos los *cargos* del exómero identificados tienen en común la presencia de varias hélices transmembrana y una distribución polarizada.

En mutantes del exómero, el tráfico de Chs3 es bloqueado en el TGN y, como consecuencia, esta enzima no es capaz de llegar a la MP y las células tienen un defecto en la síntesis de quitina (Rockenbach et al., 2012; Sanchatjate and Schekman, 2006; Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997; Starr et al., 2012; Trautwein et al., 2006). Los mutantes del exómero también son defectuosos en la fusión celular durante la conjugación debido al defecto en el tráfico de Fus1. Haga clic o pulse aquí para escribir texto. (Barfield et al., 2009; Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997). Además, las permeasas Tat2 y Mup1 de *S. cerevisiae* y la quitina sintasa Chs3 de *C. albicans* sufren una deslocalización y una acumulación intracelular parcial en ausencia del exómero (Anton et al., 2018; Anton-

Plagaro et al., 2021). Otros fenotipos identificados en los mutantes del exómero son patrones alterados de gemación, crecimiento rápido a pH 7.5, y sensibilidad a amonio, litio, sodio e higromicina B (Fell et al., 2011; Ritz et al., 2014; Santos and Snyder, 1997; Trautwein et al., 2006). Anton y colaboradores (Anton et al., 2017) realizaron un análisis de los *cargos* potenciales que pudieran ser retenidos en el TGN en mutantes del exómero, resultando en su sensibilidad a cationes de metales alcalinos. Este estudio llegó a la conclusión de que la sensibilidad se explica, al menos parcialmente, por un defecto en la localización de la bomba de extrusión de Na^+ Ena1. En los mutantes del exómero, Ena1 llega a la MP de la célula madre, pero no a la de las yemas. Estos resultados sugieren que, aunque el exómero facilita la salida de ciertas proteínas del TGN, no es siempre esencial en este proceso. Adicionalmente, este trabajo resalta la relevancia del exómero en la secreción polarizada (Bonifacino, 2014; Valdivia et al., 2002). Por otro lado, en un mutante del exómero los niveles de la proteína Ena1 están reducidos, mientras que los de la proteína Qdr2 están aumentados. Estos fenotipos son una consecuencia directa de un defecto en la ruta RIM causado por un procesamiento erróneo de la proteína Rim101 en el mutante *chs5Δ*. Por tanto, además de funcionar como un adaptador de *cargo*, el exómero puede tener funciones adicionales (Anton et al., 2017).

Este complejo está conservado en todo el *clado* de los hongos, aunque el número de ChAPs varía entre organismos. Sin embargo, no está presente en metazoos (Anton et al., 2018; Ramirez-Macias et al., 2018). Todos los hongos presentan un homólogo de Chs5 y una, dos o cuatro ChAPs, con un homólogo de Bch1 siempre presente (ChAP ancestral a partir de la cual surgieron todas las demás a través de diversos eventos de duplicación génica). Un análisis de los fenotipos asociados a la ausencia del exómero en levaduras con cuatro ChAPs (*S. cerevisiae*), dos ChAPs (*Kluyveromyces lactis* y *C. albicans*) y una ChAP (*Ustilago maydis*) demostró que la regulación de la quitina sintasa por el exómero era una adquisición evolutivamente tardía (Anton et al., 2018; Ramirez-Macias et al., 2018; Trautwein et al., 2006). Esta función surgió de forma inherente con la aparición de las múltiples ChAPs y su especialización como adaptadores de *cargo*, lo cual sugiere que el exómero podría tener otras funciones, y explica la presencia de componentes del exómero en *S. pombe* a pesar

de ser una levadura sin cantidades detectables de quitina (Arellano et al., 2000; Horisberger and Rosset, 1977).

3.3.2. El exómero en *S. pombe*

En *S. pombe* existe una proteína homóloga a Chs5 denominada Cfr1 (Cartagena-Lirola et al., 2006) y una proteína homóloga a las ChAPs denominada Bch1. Ambas proteínas se unen en un complejo que constituye la forma más sencilla de exómero, y son interdependientes para su localización en el TGN (Hoya et al., 2017; Martín-García et al., 2011). La ausencia de cualquiera de las subunidades o de ambas tiene un fenotipo similar: un ligero defecto en el proceso de fusión celular durante la conjugación, pequeñas alteraciones en la síntesis del glucano de la pared celular, crecimiento alterado bajo diferentes fuentes de estrés, defectos morfológicos en el Golgi y defectos en la citocinesis en presencia de cloruro de potasio (KCl).

Análisis de la localización de proteínas transmembrana que están involucradas en estos procesos demostraron que ninguna de ellas se queda retenida en el TGN o se deslocaliza en ausencia del exómero (Hoya et al., 2017). Cfr1 co-inmunoprecipita con Gga22 y con AP-1, y la delección simultánea del exómero y de Apm1 produce defectos severos en la morfología y el tráfico a través del TGN/endosomas tempranos, mientras que la delección simultánea del exómero y Gga22 produce defectos en la morfología y el tráfico a través del PVE/endosoma tardío (Hoya et al., 2017). Estos resultados llevan a la conclusión de que el exómero no es un adaptador de *cargo* clásico, sino que coopera con los adaptadores de clatrina en la clasificación de proteínas en el TGN, y en el mantenimiento de la integridad del TGN y el PVE. Esta cooperación también se ha descrito en *S. cerevisiae* (Anton-Plagaro et al., 2021).

3.4. Importancia de los lípidos en el tráfico de membranas

Una característica de los orgánulos celulares conservada evolutivamente es la composición fosfolipídica de sus membranas, que es esencial para conferirles identidad y función. En las células eucariotas se pueden distinguir dos territorios lipídicos principales: uno centrado en el RE, caracterizado por membranas con poca carga aniónica y alta fluidez; y otro constituido por la MP, TGN y endosomas, que presentan membranas enriquecidas en PL

con alta carga aniónica y una fluidez limitada por la presencia de altos niveles de esteroides y esfingolípidos (Bigay and Antonny, 2012; Jackson et al., 2016; Van Meer et al., 2008). Esto tiene una repercusión directa en la regulación de la actividad de proteínas y en la clasificación del *cargo* y las membranas de la ruta secretora.

La organización de los lípidos en las membranas afecta al transporte de proteínas y otros lípidos principalmente de dos formas. Primero, mediante la generación de curvatura de membrana (McMahon and Boucrot, 2015); y segundo, a través de la organización de microdominios de membrana (Simons and Ikonen, 1997). Se ha propuesto que lípidos con forma cónica como el diacilglicerol (DAG) o el ácido fosfatídico (PA) confieren curvatura local a la membrana, lo cual facilita el inicio de la formación de vesículas (Ganesan et al., 2015; Johansen et al., 2012). Por el contrario, la forma cilíndrica de lípidos como la fosfatidilcolina (PC) o el fosfatidilinositol (PI) impondría resistencia a la deformación de la membrana. Existe un gran número de enzimas que regulan la ruta secretora mediante la modificación de los niveles de estos lípidos. La asimetría de la bicapa lipídica de la membrana también influye en el tráfico vesicular. La actividad flipasa de Drs2p acumula fosfatidilserina en una de las monocapas de la membrana, facilitando la formación de curvatura (Alder-Baerens et al., 2006).

El aparato de Golgi es el orgánulo central de la ruta secretora, donde ocurren la maduración y la clasificación de los *cargos*. Varios mecanismos contribuyen a organizar de forma dinámica las distintas reacciones que ocurren en las membranas del Golgi (Lujan et al., 2021). Además, gran cantidad de proteínas de diferentes rutas de señalización se localizan en el Golgi, lo cual relaciona este orgánulo con la señalización celular. La homeostasis lipídica del Golgi se mantiene en gran parte mediante transferencia no vesicular de lípidos, que tiene lugar en los sitios de contacto de membranas (MCS) con el RE. Estos contactos se forman por la unión de un complejo VAP del RE con un número determinado de proteínas de transporte de lípidos (como las proteínas OSBP) ancladas en el TGN (Mesmin et al., 2019).

Los fosfoinosítidos, debido a su distribución subcelular altamente localizada, tienen un impacto directo en la localización y la actividad de proteínas efectoras e integrales de membrana como receptores, canales iónicos o transportadores, que interaccionan con estos lípidos y producen una respuesta fisiológica (Posor et al., 2022). El PI4P es el lípido más importante en el proceso de exocitosis, no sólo como precursor de otros fosfatidilinosítoles, sino por su papel en la unión de proteínas reguladoras a las membranas. Los niveles de PI4P se encuentran regulados por la actividad conjunta de la quinasa Stt4 en la MP, la quinasa Pik1 en el Golgi, y la fosfatasa Sac1, que mantienen estables los niveles de PI4P (De Matteis et al., 2013; Johansen et al., 2012). El reciclaje de Sac1 desde el Golgi hacia el RE está regulado por la señalización por MAPK (Blagoveshchenskaya et al., 2008; Piao et al., 2012; Piao and Mayinger, 2012). Pik1 es esencial para el tráfico anterógrado y, junto con Stt4, juega un papel importante en la regulación de algunas rutas de MAPK.

3.5. El flujo iónico en el sistema endosomal

Además de su papel en el transporte vesicular, Golgi, endosomas y vacuolas están implicados en el establecimiento y mantenimiento de gradientes iónicos y de pH a lo largo del sistema endosomal. El carácter iónico de los endosomas varía considerablemente a lo largo de la ruta endocítica, tal y como se observa en la **Figura 6**. Esto se debe a que los orgánulos cuentan con transportadores iónicos que permiten que existan diferencias en el contenido iónico de los diversos compartimentos que componen el sistema endosomal, y también que entre los orgánulos y el citoplasma. Hay varios mecanismos que permiten la localización específica de los transportadores en los distintos compartimentos. Algunos datos apuntan a una influencia recíproca entre el papel de estos orgánulos en el tráfico intracelular y en el mantenimiento del pH y la concentración de iones (Huotari and Helenius, 2011).

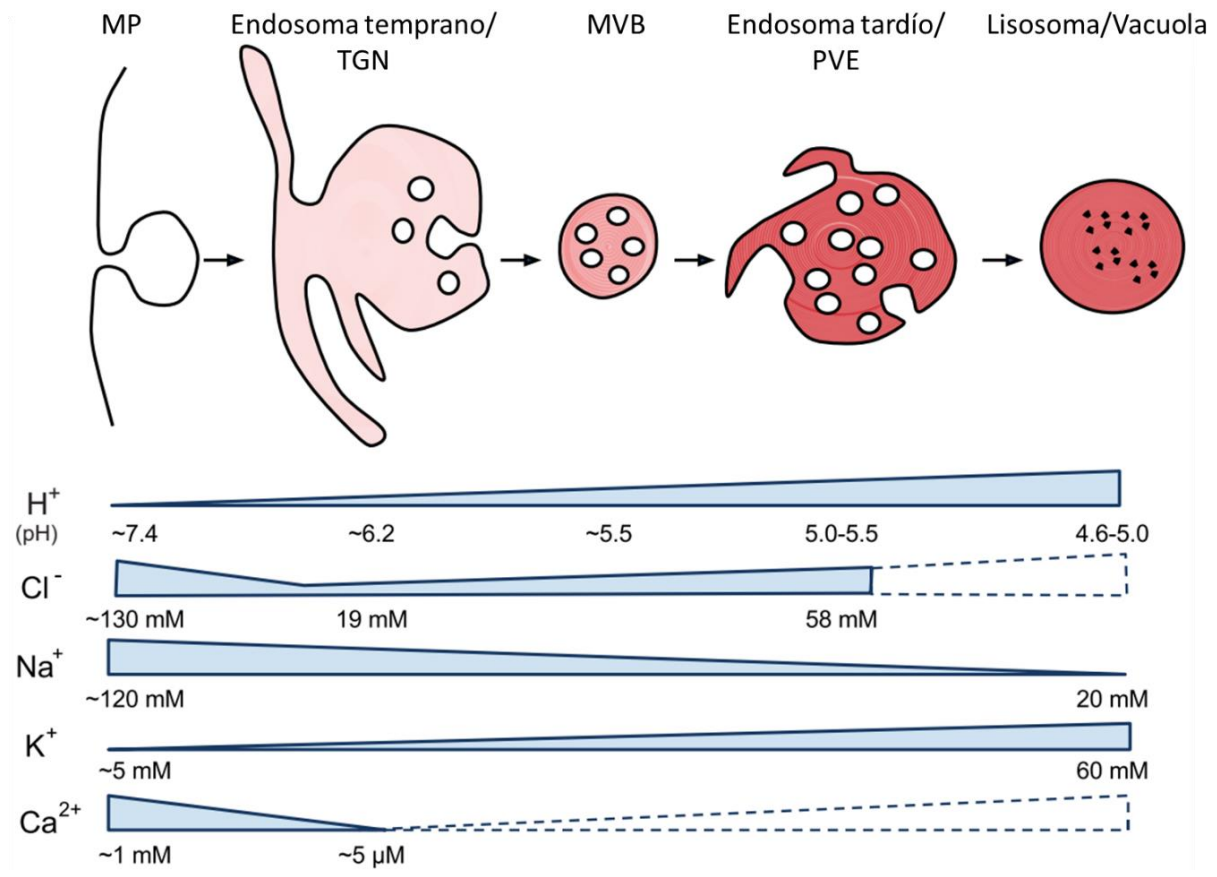


Figura 6. Flujo iónico en el sistema endosomal. Oscilaciones en la concentración de distintos iones y modificaciones del pH a lo largo de los orgánulos que forman parte del sistema endosomal, alcanzando el valor más ácido en el lisosoma/vacuola. Adaptado de Scott y Gruenberg, 2011.

Así, los mecanismos de tráfico vesicular participan en la localización de los transportadores iónicos y, a su vez, en la generación de microambientes con ciertas características de pH y concentración de iones. Estos microambientes favorecen la generación de microdominios de membrana, que facilitan el ensamblaje de proteínas necesarias para el transporte vesicular. La regulación iónica y del pH de cada uno de los orgánulos es muy importante para que sean capaces de llevar a cabo su función. Alteraciones en la localización de transportadores que conlleven modificaciones en el contenido iónico ocasionan numerosas enfermedades humanas (Dong et al., 2010; Scott and Gruenberg, 2011).

4. Homeostasis iónica en *S.pombe*

4.1. Homeostasis del potasio

El potasio es el catión más abundante en las células, y estas han desarrollado sistemas de importe y exporte para mantener la concentración intracelular de potasio dentro de un rango cuya variación produciría daño celular y alteraciones fisiológicas. Haga clic o pulse aquí para escribir texto. (Mulet et al., 2013). El potasio es importante para el establecimiento del pH intracelular y del potencial de membrana, de manera que el mantenimiento de la homeostasis de este ion representa un factor fundamental para la célula (Yenush, 2016). La acción coordinada y bien regulada de entrada y salida de K^+ garantiza la homeostasis del K^+ (Ariño et al., 2014, 2019; Calero and Ramos, 2003).

La entrada de potasio en las células de *S. pombe* se produce mayoritariamente a través de los transportadores de alta afinidad Trk1 y Trk2 (**Figura 7A**). La delección simple de ambos transportadores provoca una leve sensibilidad a NaCl pero no a K^+ limitante (Balcells et al., 1999; Calero et al., 2000; Lichtenberg-Fraté et al., 1996a, 1996b). En cambio, deleccionar tanto *trk1+* como *trk2+* provoca una reducción severa en el crecimiento cuando el K^+ es escaso, demostrando que la presencia de uno de los transportadores es suficiente para mantener la homeostasis del K^+ (Calero et al., 2000, 2004). Por otro lado, la cepa *trk1Δ trk2Δ* crece bien si hay una concentración de K^+ superior a 20 mM en el medio, y transporta Rb^+ (aunque con menor afinidad), mientras que es sensible a Na^+ , higromicina B y pH bajo (Calero et al., 2004). Esto sugiere que otros transportadores, que podrían ser no específicos, captan el ion en estas condiciones. Algunos resultados sugieren que estos transportadores putativos podrían estar regulados por la concentración de potasio intracelular. Una alternativa podría ser una entrada de K^+ ectópica estimulada por alteraciones en el pH interno y/o alteraciones en el potencial de membrana, como está descrito en la levadura de gemación (Madrid et al., 1998).

Atendiendo a la salida de K^+ , Cta3 de *S. pombe* (**Figura 7A**) es una ATPasa tipo P (homóloga a la ATPasa Ena1 de *S. cerevisiae*) específica de eflujo, que media el exporte de K^+ pero no de Na^+ (Benito et al., 2002). El gen *cta3+* se induce en presencia de cationes como el sodio o el potasio de un modo dependiente de las funciones de las proteínas de la ruta de

respuesta a estrés Wis1 y Sty1, y de los factores de transcripción Atf1, Pcr1 y Prr1 (Greenall et al., 2002; Nishikawa et al., 1999). La regulación de *cta3+* en presencia de estrés está regulada a nivel transcripcional de una manera positiva a través de Sty1 y Atf1, y negativa a través de los represores Tup11 y Tup12. Los represores Tup aseguran que no se produzca la inducción de *cta3+* en presencia de otras formas de estrés cuya respuesta también esté mediada por la ruta de Sty1, como puede ser el estrés oxidativo, choque térmico, ausencia de carbono o diferenciación sexual (Greenall et al., 2002).

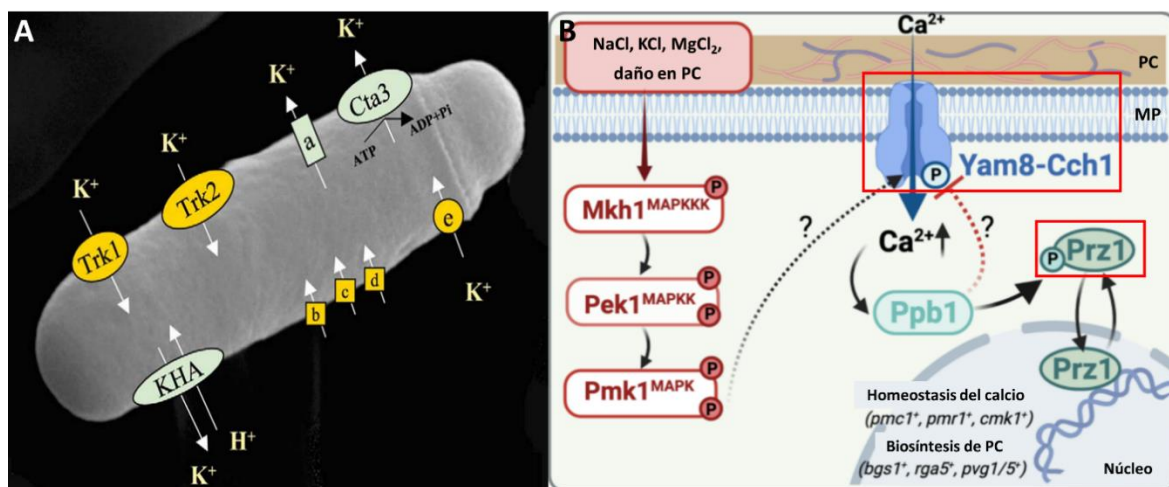


Figura 7. Transporte y homeostasis iónica. (A) La entrada de potasio en las células de *S. pombe* se produce principalmente a través de los canales Trk1 y Trk2, y la salida a través de la bomba Cta3. Calero y Ramos., 2003. (B) Ruta de la calcineurina. El calcio entra en la célula a través de los canales Cch1 y Yam8, activa a la fosfatasa calcineurina (Ppb1) y promueve la respuesta transcripcional mediante Prz1. PC: Pared Celular; MP: MP. Adaptado de Cansado et al., 2022.

El genoma de *S. pombe* no alberga genes adicionales con una secuencia homóloga a Trk1 y/o Trk2, pero sí tiene homólogos de otros transportadores de *S. cerevisiae* (Ramos et al., 2011; Wood et al., 2002, 2012). El homólogo de *NHA1* de *S. cerevisiae* (*nhe1+*) es un transportador específico de Na^+ cuya delección resulta en sensibilidad a NaCl, pero no a KCl (Balcells et al., 1997; Kinclová et al., 2002). *kha1+* es un homólogo del antiportador de K^+/H^+ *KHA1*, que está potencialmente involucrado en la regulación del K^+ y la homeostasis del pH en el aparato de Golgi, y cuya delección produce acumulación de K^+ (Ariño et al., 2014; Ramírez et al., 1998; Yenush, 2016). La participación de SpKha1 en la homeostasis del K^+ no ha sido descrita todavía. El antiportador de Na^+/H^+ Nhx1 (homólogo de *NHX1* de *S. cerevisiae*) se localiza en el TGN y el PVE, donde contribuye a mantener el pH mediando la

internalización de potasio en estos orgánulos a cambio de protones (Kojima et al., 2012). La delección de gen *nhx1+* conlleva fenotipos como la sensibilidad a pH bajo y a altas concentraciones salinas, y se ha descrito un papel de este transportador en la adaptación al choque osmótico y al exceso de potasio (Yenush, 2016).

Mientras que la delección de genes involucrados en la homeostasis del K^+ lleva a defectos en el crecimiento en medio con K^+ limitante (Calero and Ramos, 2003), la sensibilidad a K^+ es un fenotipo infrecuente. Este fenotipo ha sido reportado en el mutante de *S. pombe* *pzh1Δ*, que es defectivo en una fosfatasa tipo PPZ que regula la entrada de Na^+ de una manera independiente a Sod2 y Trk1 (Balcells et al., 1997, 1999); y en el mutante de *S. cerevisiae* *ena1-4Δ kha1Δ*, que es defectivo en los sistemas de eflujo de K^+ (Benito et al., 2002).

Los mutantes del exómero de *S. pombe* presentan defectos en su crecimiento en presencia de KCl 0,6 M, pero crecen bien en presencia de sorbitol 1,2 M, un medio con una osmolaridad similar a la de KCl 0,6 M (Hoya et al., 2017; Moro et al., 2021). Además, el sorbitol no mejora el crecimiento en presencia de KCl, y las células mutantes son capaces de recuperar su crecimiento normal al pasar de medio con KCl a medio sin KCl (Moro et al., 2021).

4.2. Homeostasis del calcio

El calcio es un ion vital para el funcionamiento celular. La homeostasis del calcio es un proceso muy relacionado con funciones celulares básicas como el metabolismo, síntesis, modificación, plegamiento y secreción de proteínas, la progresión a través del ciclo celular, o la apoptosis.

El RE es un reservorio de calcio intracelular, desde donde sale hacia el citoplasma en determinadas circunstancias para desempeñar funciones importantes como señalizador. Dentro de este orgánulo hay chaperonas dependientes de calcio, como son la calnexina o la calreticulina, que ayudan al correcto plegamiento correcto de las proteínas (Corbett and Michalak, 2000).

En el citoplasma, la calcineurina es una proteína regulada por calcio con funciones necesarias para la citocinesis y para la homeostasis iónica. Se trata de una serín-treonín-

fosfatasa de tipo 2B regulada por Ca^{2+} /calmodulina. En *S. pombe*, la subunidad catalítica de esta fosfatasa está codificada por el gen *ppb1+*. Este gen no es esencial, pero su ausencia provoca cierto retraso en la citocinesis y la aparición de células ramificadas (Yoshida et al., 1994). Además, se sabe que Ppb1 tiene un papel antagonista en la homeostasis del cloruro al de la quinasa de la ruta de integridad celular Pmk1 (ver más adelante; Sugiura et al., 1998, 1999; Toda et al., 1996). Existe otra subunidad de la calcineurina, la subunidad reguladora Cnb1, que ejerce su función al interaccionar con el dominio C-terminal de la subunidad Ppb1.

La entrada de calcio a las células de *S. pombe* tiene lugar a través de los canales Cch1 y Yam8 (**Figura 7B**), cuya apertura y cierre están regulados por la quinasa Pmk1 y por la fosfatasa calcineurina (Revisado por Pérez y colaboradores; Pérez et al., 2018). Por un lado, ciertos cloruros provocan daño en la pared celular y, además, conducen a la fosforilación de Cch1/Yam8 por la quinasa Pmk1. Esta fosforilación provoca la apertura de los canales y el incremento del calcio intracelular, lo que conlleva la activación de la calcineurina. Por otro lado, la fosfatasa calcineurina desfosforila a los canales, provocando su cierre (Deng et al., 2006; Ma et al., 2011). Además, la calcineurina también puede activarse por otras vías independientes de los canales Cch1-Yam8, al salir calcio de los orgánulos hacia el citoplasma, y por parte de otros agentes no causantes de daño en la pared celular.

En *S. pombe* existen tres canales de tipo TRP (*Transient Receptor Potential*) denominados Pkd2, Trp663 y Trp1322 (Dong et al., 2010; Morris et al., 2019). Los canales de esta familia actúan como sensores de toxicidad química y estímulos físicos, y presentan selectividad iónica, por lo que cada uno es permeable a un tipo de ion específico (Zhang et al., 2023). Pkd2 es un canal de Ca^{2+} homólogo de las polycistinas de mamíferos, que podría estar relacionado con la ruta de integridad celular (Palmer et al., 2005). Es una proteína esencial, necesaria para la proliferación celular, tanto para el crecimiento como para la división celular (Morris et al., 2019; Sinha et al., 2022). Durante la interfase se localiza en los polos celulares, donde promueve el crecimiento polarizado de las células (Sinha et al., 2022) y deja entrar calcio a la célula en respuesta a tensión en la membrana (Poddar et al., 2022). Su sensibilidad a fuerzas de tensión y su localización en la MP hacen que Pkd2 sea un

candidato ideal para detectar la tensión de membrana y regular la homeostasis de la turgencia de la membrana (Poddar et al., 2022; Sinha et al., 2022). Pkd2 también se localiza en el RE, desde donde regula la señalización por calcio en el citoplasma (Koyano et al., 2023).

La fosfatasa calcineurina (Ppb1) activada desfosforila a ciertas proteínas, como es el caso de Prz1. Este factor de transcripción, al estar desfosforilado, viaja al núcleo y ejerce funciones en la regulación de numerosos genes (**Figura 7B**). El promotor de *prz1+* y de otros genes que responden a calcio tienen un elemento de respuesta a calcineurina (CDRE), que participa en la homeostasis del calcio, pero no en la del cloruro (Hirayama et al., 2003). Entre los numerosos genes encontrados en un rastreo masivo que son regulados por Prz1 se encuentra Cfr1, el componente del exómero de *S. pombe* (Chatfield-Reed et al., 2016), aunque se desconoce el significado funcional de esta fosforilación, ya que ni la cantidad ni la localización de Cfr1 varía en presencia de estrés (resultados sin publicar).

En resumen, existen dos vías de la ruta de la calcineurina en *S. pombe*: una en la que participa Prz1 regulando numerosos genes, que es más importante para la homeostasis del calcio, y otra en la que actúa de forma antagónica a la ruta de integridad, que participa en la regulación de la apertura de Cch1-Yam8, y que sería más importante para la homeostasis del cloruro y para la regulación de los niveles intracelulares de calcio (Deng et al., 2006; Hirayama et al., 2003; Ma et al., 2011). La función en la citocinesis y en la exocitosis de la calcineurina está relacionada con las funciones de la 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa Its3 (Zhang et al., 2000) y de la Rab GTPasa Ypt3 (Cheng et al., 2002).

5. Las cascadas de MAPK

Las células están sujetas constantemente a variaciones en las condiciones intra y extracelulares, algo que es particularmente relevante para la supervivencia de los organismos unicelulares, ya que están más expuestos a los cambios ambientales. En consecuencia, estos organismos han desarrollado mecanismos de respuesta a esos cambios para asegurar la integridad celular. Estos mecanismos dependen de rutas de señalización que detectan los estímulos y ponen en marcha respuestas para promover la adaptación y la supervivencia. La fosforilación y desfosforilación de proteínas son mecanismos de

respuesta rápida y reversible frente a los estímulos externos. Típicamente, las rutas incluyen sensores de superficie celular que detectan los estímulos y transmiten una señal a una cascada de MAPK. Se produce la fosforilación secuencial de estas quinasas, lo que da como resultado la inducción transcripcional de genes por la fosforilación de factores de transcripción específicos. La transmisión de la señal se modula, además, por la actividad de fosfatasas que desfosforilan las MAPK. Las rutas de MAPK están muy conservadas en la evolución.

En *S. pombe* existen tres cascadas de MAPK diferentes, una de ellas es necesaria para la conjugación, otra media la respuesta a estrés (SAPK, *Stress-Activated Protein Kinase*) y otra es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular (CIP, *Cell Integrity Pathway*; Perez and Cansado, 2010).

5.1. La ruta de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*

La ruta SAPK de *S. pombe* (**Figura 8**), al igual que su homóloga en metazoos (p38), participa en la respuesta a un amplio abanico de estímulos como el estrés oxidativo, térmico, osmótico o nutricional (Papadakis and Workman, 2015). Estos estímulos se detectan en la MP por un sistema muy similar al sistema de dos componentes bacteriano. Los sensores de estrés descritos en la levadura de fisión son Mak1, Mak2 y Mak3; estos sensores transmiten la señal al sistema de dos componentes formado por Mpr1 y Mcs4. Mpr1 actúa como un fosfo-transmisor gracias a su histidina de la posición 221 (Nguyen et al., 2000), mientras que el receptor de la fosforilación es Mcs4, un inhibidor de la catástrofe mitótica (Shiozaki et al., 1997).

Desde el sistema de dos componentes se transmite la señal al módulo de MAPK. En primer lugar, actúan las dos MAPKKK descritas: Wak1/Wis4 y Win1 (un regulador mitótico; Ogden and Fantes, 1986). Se sabe que ninguna de ellas es necesaria para la señalización en presencia de estrés térmico ni en respuesta a un bajo contenido de glucosa en el medio de cultivo (Shiozaki et al., 1998; Zhou et al., 2010). Las MAPKKK fosforilan a la MAPKK Wis1 en la serina 469 y en la treonina 473 (Shieh, et al., 1998a; 1998b). Wis1 es un iniciador de la mitosis (Shiozaki and Russell, 1995) que se localiza en el citoplasma y que fosforila a la MAPK Sty1/Spc1 en la tirosina 173 y en la treonina 171. Sty1, homóloga de Hog1 de *S. cerevisiae*,

viaja del citoplasma hacia el núcleo cuando está fosforilada para continuar con la señalización de la ruta; se sabe que la fosforilación única en la treonina 171 puede llevar a cabo funciones en estrés osmótico, pero no en respuesta a estrés oxidativo (Vázquez et al., 2015).

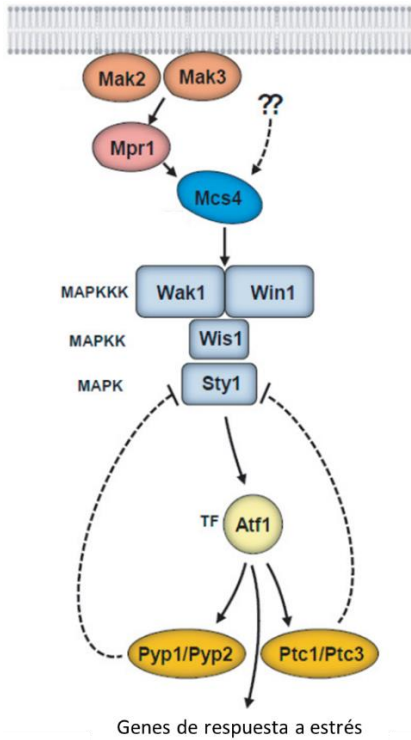


Figura 8. Ruta de respuesta a estrés (SAPK). El estrés extracelular se detecta a través de las proteínas Mak. La señal se transmite por el sistema de dos componentes hacia el módulo de MAPK y, finalmente, la fosforilación de Atf1 (entre otros factores) lleva a cabo la regulación transcripcional. La ruta está autoinhibida por la acción de las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1 y Ptc3. Adaptado de Gómez-Gil et al., 2020.

En el núcleo, Sty1 fosforila al factor de transcripción Atf1 (Wilkinson et al., 1996), propiciando su dimerización con otro factor denominado Pcr1 (Lawrence et al., 2007). La acción de Atf1 estimula la transcripción de una gran cantidad de genes, entre ellos los de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la catalasa y Pyp2, una fosfatasa de la ruta (Wilkinson et al., 1996). Los genes activados permiten cambios metabólicos para crecer en presencia de los distintos tipos de estrés. La ruta de estrés también promueve la transcripción de *cta3+*, importante para la homeostasis iónica (Nishikawa et al., 1999). Además, Sty1 fosforila a Rnc1 (Prieto-Ruiz et al., 2020), una proteína de unión a RNA que actúa como modulador negativo de la ruta SAPK mediante su unión a los mRNAs de activadores (Wak1 y Wis1) y reguladores negativos (Atf1, Pyp1 y Pyp2). Rnc1 también se une y estabiliza el mRNA de la fosfatasa Pmp1, que desfosforila e inactiva a la MAPK de la ruta CIP, Pmk1 (ver más adelante).

La activación de Sty1 por estrés oxidativo conlleva una despolarización de Cdc42 hacia parches laterales en la célula, lo cual paraliza el crecimiento polarizado hasta que las condiciones de crecimiento son favorables de nuevo (Salat-Canela et al., 2021). Estos parches laterales de Cdc42 han sido observados en varias condiciones de activación de Sty1, incluyendo el tratamiento con Latrunculina A (Hercyk et al., 2019; Mutavchiev et al., 2016), carencia de nutrientes (Chen et al., 2019), choque térmico (Vjestica et al., 2013) y choque osmótico (Haupt et al., 2018).

Las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1 y Ptc3 desfosforilan a Sty1, inhibiendo la ruta. El hecho de que las fosfatasas se expresen al activarse la ruta conlleva un mecanismo de retroalimentación negativo (Degols et al., 1996; Madrid et al., 2007; Millar et al., 1995; Shiozaki and Russell, 1995; Wilkinson et al., 1996).

Las deleciones de *sty1+*, de *wis1+* o de *atf1+* provocan sensibilidad a las fuentes de estrés que activan la ruta (osmótico, oxidativo); sin embargo, a diferencia de las otras deleciones, la de *atf1+*, no provoca parada en G2/M (Wilkinson et al., 1996). Por tanto, la señalización en mitosis y ciclo celular de la cascada tiene lugar a través de otro factor diferente.

5.2. La ruta de integridad celular (CIP) en *S. pombe*

En la levadura de fisión existe una cascada de MAPK que participa en el mantenimiento de la integridad celular y que, aunque tiene algunos aspectos en común con la ruta de integridad de la pared celular de *S. cerevisiae*, mediada por Slt2/Mpk1, no es totalmente equivalente a la misma. En *S. pombe* esta ruta responde a una gran variedad de estímulos: se activa en presencia de estrés salino, osmótico, oxidativo, térmico, nutricional (bajada en la concentración de glucosa en el medio de cultivo) y en respuesta a daños en la pared celular, y su disfunción resulta en defecto en la integridad celular y en citoquinesis (Cansado et al., 2022; Edreira et al., 2020; Perez and Cansado, 2010).

En la cascada participan tres quinasas (**Figura 9**): Mkh1, Skh1/Pek1 y Pmk1/Spm1 (Loewith et al., 2000; Madrid et al., 2006; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Toda et al., 1996). La MAPK de la ruta es Pmk1/Spm1, una proteína de 422 aminoácidos y un peso molecular de 48 kDa, que presenta similitud con Slt2 (la MAPK de la ruta de integridad en la levadura

de gemación). La delección de *pmk1+* provoca varios fenotipos como sensibilidad a concentraciones altas de KCl, sensibilidad al tratamiento con β -glucanasa, defectos en septación y aparición de un porcentaje de células encadenadas (Toda et al., 1996; Zaitsevskaya-Carter, 1997). Por lo tanto, la quinasa Pmk1 tiene funciones en el mantenimiento de la morfología celular, en la citocinesis, en la viabilidad celular y en la homeostasis iónica.

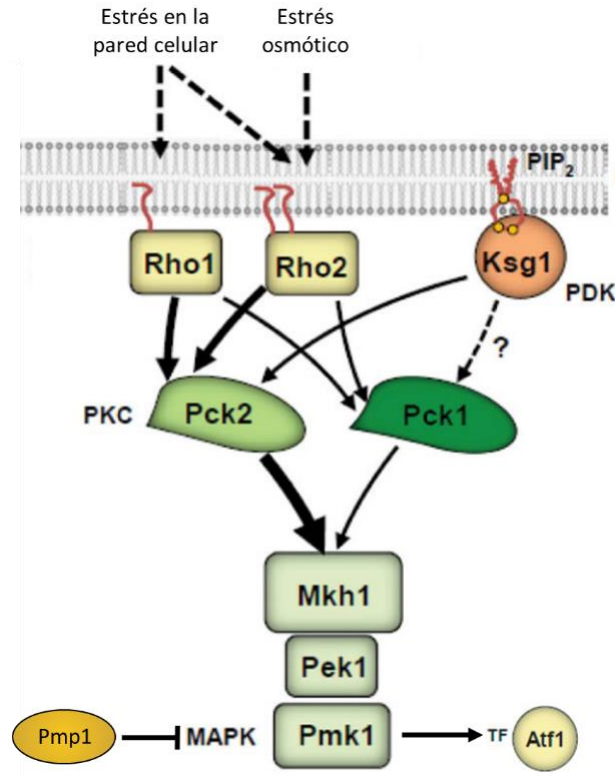


Figura 9. Ruta de integridad celular (CIP). Diferentes tipos de estrés activan la ruta mediante distintas vías a través de las proteínas Rho1/2 y Pck1/2. La señal se transmite al módulo de MAPK y la regulación transcripcional se produce principalmente mediante la fosforilación de Atf1 (entre otros factores). La fosfatasa Pmp1 es la principal inhibidora de la ruta. Adaptado de Madrid et al., 2017.

La fosforilación de Pmk1 es más acusada en la mitosis y, principalmente, durante la citocinesis (Madrid et al., 2007); además, también se fosforila en presencia de los estímulos capaces de activar la ruta de integridad. Esta proteína se activa en el citoplasma y el septo, y ambas formas (activa e inactiva) pueden transitar hacia el núcleo (Madrid et al., 2006), donde podría ser importante para la regulación transcripcional de la integridad celular (Sánchez-Mir et al., 2012). La fosforilación de Pmk1 ocurre en la T186 y en la Y188, y la encargada de unirse a ella y fosforilarla es la MAPKK Skh1/Pek1. Por otro lado, en ausencia de estrés, Pek1 desfosforilada e inactiva se une a Pmk1 en un proceso de inhibición. La delección de *pek1+* provoca fenotipos muy similares a la de *pmk1+* (Sugiura et al., 1999). La

fosforilación de Skh1/Pek1 la realiza la MAPKKK Mkh1. La delección de esta quinasa presenta los mismos fenotipos que la eliminación de las otras dos (Loewith et al., 2000; Sengar et al., 1997). Cuando está activada, Mkh1 transmite la señal de activación a Pek1 y Pmk1 formando un complejo ternario, gracias a la mediación de Pek1 (Loewith et al., 2000; Madrid et al., 2006; Sánchez-Mir et al., 2014a), que actúa en el citoplasma debido a que tanto Pek1 como Mkh1 solo se localizan en el citoplasma y en el septo (Madrid et al., 2006). Estas quinasas están reguladas por activadores que incluyen las GTPasas Rho1 y Rho2, y los homólogos de PKC, Pck1 y Pck2 (Revisado por Cansado y colaboradores; Cansado et al., 2022).

Cuando Pmk1 se encuentra fosforilada y activa, es capaz de fosforilar a diversas proteínas para llevar a cabo cambios en la célula. Entre las proteínas fosforiladas por Pmk1 se encuentra Atf1, un factor de transcripción que también es fosforilado por la quinasa Sty1; entre los genes afectados por Atf1 se encuentran *its8+*, una enzima que participa en la síntesis del GPI (Takada et al., 2007), y *ecm33+*, una proteína de que modula la señalización de Pmk1 (Takada et al., 2010). La quinasa Pmk1 asociada a membranas también puede llevar a cabo funciones relacionadas con la homeostasis del cloruro o la separación celular (Sánchez-Mir et al., 2012), y participa en la homeostasis del calcio mediante la fosforilación de los canales Cch1-Yam8, actuando de manera antagonista a la calcineurina (Cansado et al., 2022; Ma et al., 2011). Además, Pmk1 fosforila a las proteínas de unión a RNA Nrd1 y Rnc1. Nrd1 participa en la regulación de los RNA mensajeros de la miosina de tipo II y, por tanto, en la regulación de la citocinesis (Satoh et al., 2009). Por su parte, como se ha comentado antes, Rnc1 estabiliza los RNA mensajeros de la fosfatasa Pmp1, en un proceso de autoinhibición que tiene una relación directa con Sty1. La fosfatasa Pmp1/Dsp1 es la principal inhibidora de la ruta. Esta fosfatasa desfosforila a la quinasa Pmk1 y tiene funciones compartidas con la calcineurina (Sugiura et al., 1998). Se activa por la acción de Rnc1 y Sty1, lo cual establece una relación de antagonismo entre la ruta SAPK y la ruta CIP. Otras fosfatasas que actúan en la ruta son las serina-treonina fosfatasas Ptc1 y Ptc3 y las tirosina fosfatasas Pyp1 y Pyp2, que también actúan en la ruta de estrés de Sty1; de hecho, se expresan al activarse la cascada de MAPK de Sty1, existiendo cierto papel antagónico

entre ambas rutas (**Figura 10A**; Madrid et al., 2006, 2007; Prieto-Ruiz et al., 2020; Takada et al., 2007).

5.2.1. Mecanosensores en *S. pombe*

En la levadura de gemación existen un conjunto de mecanosensores, presentes en la MP, que detectan daños en la pared celular y participan en la activación de la ruta de Slit2/Mpk1. En *S. pombe* se han descrito dos proteínas (Wsc1 y Mtl2) que, por similitud de secuencia, se consideraron posibles homólogos estructurales de mecanosensores de *S. cerevisiae*.

Ambas proteínas se asocian a la superficie celular. Wsc1, que se asocia a la MP y a la pared celular a través de un dominio extracelular, se agrupa en zonas de la superficie donde hay estrés mecánico, y difunde lateralmente cuando el estrés desaparece (Neeli-Venkata et al., 2021). Wsc1 y Mtl2 transmiten señales principalmente a través de Rgf1, una GEF que activa la GTPasa Rho1, que es la que estabiliza a los activadores Pck1 y Pck2 (Pérez et al., 2018). El fenotipo *vic* (viable en presencia de inmunosupresor y cloruro) es característico de las deleciones de los componentes de la ruta de integridad, y procede de la función antagónica entre esta ruta y la de la calcineurina en la homeostasis del cloruro (**Figura 10B**); en ausencia de función de la calcineurina (provocada por la presencia del inmunosupresor FK506 en el medio de cultivo) las células son sensibles a cloruro, pero esta sensibilidad se suprime al eliminarse la activación de la ruta de integridad (Sugiura et al., 1998, 1999). Los mutantes *wsc1Δ* y *mtl2Δ* no presentan fenotipo *vic*. Esto, y el hecho de que la deleción de *wsc1+* y *mtl2+* no afecta a la activación de la ruta, sugiere que, aunque estas proteínas activan Rho1 en respuesta a estrés, no actúan como sensores de la ruta CIP (Cruz et al., 2013).

5.2.2. Las GTPasas Rho en la ruta de integridad

Las proteínas Rho están muy conservadas en la evolución y son muy importantes para la regulación del citoesqueleto, para la morfogénesis y para el crecimiento. En la levadura de fisión existen seis proteínas de la familia Rho: Rho1-2-3-4-5 y Cdc42. Los activadores principales de la ruta de integridad son Rho2 y, en menor medida, Rho1 (Pérez et al., 2018), mientras que Cdc42 no participa en la ruta (Madrid et al., 2006).

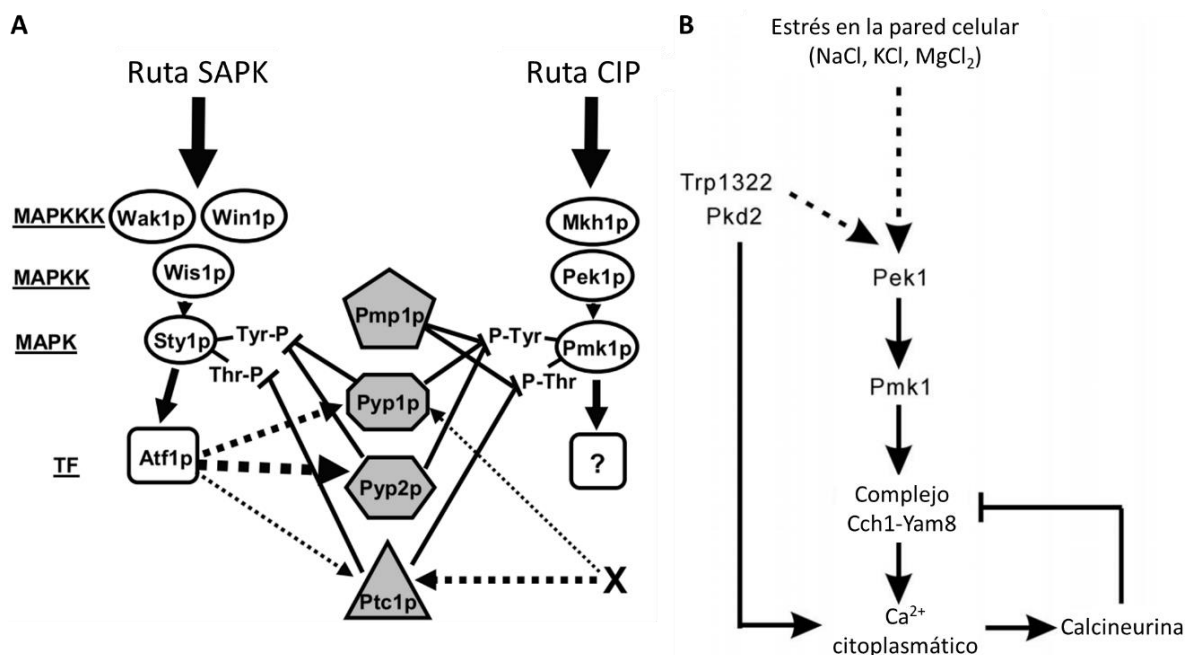


Figura 10. Interacciones entre rutas. (A) Relación entre la ruta de integridad (CIP) y la ruta de estrés (SAPK). Las fosfatasa Pmp1, Pyp1, Pyp2 y Ptc1 actúan en ambas rutas, y se expresan al activarse la ruta SAPK. Adaptado de Madrid et al., 2007. (B) Relación entre la ruta de la calcineurina y la ruta de integridad celular. En condiciones de estrés, la ruta de integridad fosforila a los canales Cch1 y Yam8, promoviendo la entrada de calcio. Adaptado de Ma et al., 2011.

Rho1 es esencial, regula la síntesis de la pared celular a través de las quinasas Pck1 y Pck2, organiza el citoesqueleto de actina y participa en la respuesta celular a estrés (Arellano et al., 1996; Nakano et al., 1997; Sánchez-Mir et al., 2014a). Rho1 regula la señal de la ruta CIP de una forma aditiva y/o independiente a Rho2 (García et al., 2009; Sánchez-Mir et al., 2014a). Sus GEF conocidos son Rgf1, Rgf2 y Rgf3, y sus GAP son Rga1, Rga5 y Rga8 (Revisado por García y colaboradores; García et al., 2022). Rgf1 y Rho1 son necesarias para la activación de la ruta de integridad en presencia de estrés hiperosmótico/hipoosmótico o de daños en la pared celular, pero no en presencia de estrés térmico, oxidativo o deprivación de glucosa (García et al., 2009). Una disminución en la función de Rho1 provoca daños celulares que activan a la ruta de integridad, siendo esto perjudicial para las células (Viana et al., 2013).

Rho2 no es esencial, pero también participa en la síntesis de pared celular a través de Pck2. Entre los GAP de Rho2 se encuentran Rga2, Rga4, Rga6 y Rga7, mientras que sus GEFs son desconocidos. Rho2 participa en la activación de la ruta de integridad principalmente a

través de Pck2. Esta GTPasa depende de modificaciones lipídicas postraduccionales y de su interacción con PI(4,5)P₂ para su unión a la membrana y para su función en la ruta de integridad (Barba et al., 2008; Calonge et al., 2000; Cansado et al., 2010; Franco et al., 2017; Kabeche et al., 2015; Ma et al., 2006; Sánchez-Mir et al., 2014b; Franco, et al., 2014; Soto et al., 2010; Villar-Tajadura et al., 2008). Rho4 y Rho5 también están implicados en la activación de la ruta de integridad a través de Pck1 y, sobre todo, Pck2 (Doi et al., 2015).

La principal vía de activación de la cascada en presencia de múltiples estímulos se inicia en el módulo Rho2-Pck2 (Barba et al., 2008). Sin embargo, en respuesta a ciertos estímulos como el estrés oxidativo o térmico, este módulo no es necesario. En presencia de estrés oxidativo, puede que exista un mecanismo específico, y en presencia de estrés térmico la señalización se transmite desde Pck2. Rho1 y Pck1/ Pck2 participan en la activación de la ruta en respuesta a daños en la pared celular (Sánchez-Mir et al., 2014a). Sin embargo, Pck1 regula negativamente la actividad basal de Pmk1, aun sin unirse a ninguno de los componentes de la cascada de MAPK. Todos estos datos apuntan a que la regulación de la cascada es compleja, tanto a nivel basal como en presencia de estímulos que la activen (Barba et al., 2008).

5.2.3. Ortólogos de PKC

Todas las isoformas de PKC comparten una estructura básica que incluye un dominio regulador en N-terminal unido por una región bisagra a un dominio quinasa altamente conservado en C-terminal. Dentro del dominio regulador existe un segmento de autoinhibición y dos módulos putativos de unión a membrana, C1 y C2 (Newton, 2018). El dominio quinasa en C-terminal contiene tres sitios de fosforilación conservados conocidos como bucle de activación (AL), motivo de giro (TM) y motivo hidrofóbico (HM), que son esenciales para la actividad catalítica (Freeley et al., 2011; Madrid et al., 2016, 2017).

S. pombe tiene dos ortólogos de PKC, conocidos como Pck1 y Pck2, que tienen papeles esenciales y redundantes en la viabilidad celular (Arellano et al., 1999; Toda et al., 1993). Los dos contienen los dominios típicos de las PKCs, además de dos motivos HR1 en N-terminal, que son los responsables de la unión con Rho1 y Rho2 (Arellano et al., 1999). La activación de Pck1 es específica de Rho1, fundamentalmente en respuesta a estrés en la

pared celular (Sánchez-Mir et al., 2014a). Como se ha dicho antes, el módulo Rho2-Pck2 es el activador principal de la ruta CIP en condiciones de estrés, aunque Rho1 también puede activar a Pck2 (Roncero et al., 2021). Además, el ortólogo de PDK-1 en *S. pombe*, Ksg1, activa la ruta directamente a nivel de Pck2 (Cansado et al., 2022). Pck1 y Pck2 se asocian *in vivo* a Mkh1, la MAPKKK del bloque de quinasas de la ruta CIP (Sánchez-Mir et al., 2014a).

5.2.4. Localización de los componentes de la ruta CIP y su relación con los lípidos

Los mecanosensores Wsc1 y Mtl2 se localizan en la superficie celular. Wsc1 se localiza en los sitios de crecimiento activo (polos y septo de división), mientras que Mtl2 se localiza por toda la periferia celular, aunque principalmente en septo y polos (Cruz et al., 2013).

Rho1 se localiza uniformemente a lo largo de la MP y en membranas internas, y está ligeramente enriquecido en los polos (Arellano et al., 1997; Nakano et al., 1997). Su localización en la membrana depende de un motivo CAAX en C-terminal que está geranil-geranilado. Además, su retención en los polos depende parcialmente de un gradiente de fosfatidilserina que acumula carga negativa en los extremos de la célula con respecto a los laterales (Haupt and Minc, 2017).

Por su parte, Rho2 se localiza en los sitios de crecimiento activo. Necesita una modificación postraducciona lipídica para su unión a la membrana y la activación de CIP (Franco et al., 2017; Kabeche et al., 2015; Sánchez-Mir et al., 2014b). Este proceso se produce en tres pasos secuenciales: farnesilación de Rho2 en C197 por Cpp1 (Ma et al., 2006), metilación del grupo carboxilo libre de la cisteína isoprenilada por Mam4 (Franco et al., 2017) y palmitoilación en C196 por Erf2 (Sánchez-Mir et al., 2014b). Este proceso de lipidación en tres pasos es esencial para la localización de Rho2 en la MP y para la correcta activación de CIP (Cansado, 2018). Rho2 forma cúmulos en la MP que colocalizan con PI(4,5)P₂, aunque ambos se asocian a la membrana de forma independiente. Estos cúmulos de Rho2 no dependen del fosfoinosítido, pero la colocalización entre ambos podría ser importante para la activación de la ruta (Kabeche et al., 2015).

Rgf1, el principal GEF de Rho1 y Rho2, se localiza en los polos y el septo de división (Edreira et al., 2018; García et al., 2006; Kabeche et al., 2015). Se ha propuesto que se une al PI(4,5)P2 mediante su dominio PH (Muñoz et al., 2014), aunque otros resultados sugieren lo contrario (Kabeche, 2015). Se relocaliza al citoplasma después de un choque osmótico de forma dependiente de PI(4,5)P2 (Kabeche et al., 2015).

Pck1 y Pck2 colocalizan con Rho 1y Rho2 en las zonas de crecimiento polarizado, y se relocalizan al septo de división antes de la constricción del anillo (Magliozzi et al., 2020; Sayers et al., 2000). Al igual que Rgf1, Pck2 se relocaliza al citoplasma después de un choque osmótico de forma dependiente de PI(4,5)P2, aunque no se asocia con los cúmulos de este fosfoinosítido (Kabeche et al., 2015). Pmk1 promueve la translocación de Pck2 a gránulos de estrés después de un estrés térmico para prevenir la hiperactivación de la ruta en esas circunstancias (Kanda et al., 2021).

Aunque Mkh1 es una proteína citoplásmica, también puede localizarse en el septo durante citocinesis y en los polos celulares en las fases G1/S (Kanda et al., 2016; Madrid et al., 2006). La localización de Mkh1 en los polos celulares parece ser necesaria para que la señalización se transmita hasta Pmk1, está regulada por Skb5, y depende de Pck2 (Kanda et al., 2016). Al igual que Mkh1, Pek1 es mayoritariamente citoplásmica y también se localiza en el septo durante citocinesis (Madrid et al., 2006).

La localización de Pmk1 varía a lo largo del ciclo celular con independencia de su estado de fosforilación; está constitutivamente localizada en el citoplasma y el núcleo, pero también puede encontrarse en el huso mitótico o en el septo de división (Madrid et al., 2006).

Los componentes de CIP, Rgf1, Pck1, Pck2 y Pmk1 cooperan para localizar los marcadores de polaridad Tea1, Tea4 y Pom1 en los polos celulares. Además, se ha sugerido que la actividad CIP puede regular la homeostasis lipídica de la membrana (Dodgson et al., 2017).

6. Los complejos TOR

Las rutas en las que participan los complejos TOR están muy conservadas en la evolución. En estas rutas participan las denominadas quinasas de la familia TOR (*Target Of Rapamycin*), que están relacionadas con las fosfoinosítido-quinasas. Los complejos TOR median la transducción de señales desde el medio externo hacia el interior de la célula, permitiendo la coordinación del crecimiento y la división celular con la disponibilidad de nutrientes. Cada vez se encuentran más conexiones entre estas rutas de señalización y otros mecanismos de señalización celular, como es la ruta de integridad celular (Madrid et al., 2016). Además, su alteración está asociada al envejecimiento y al desarrollo de algunas enfermedades (Laplanche and Sabatini, 2012). En mamíferos existen dos complejos TOR que comparten la misma quinsa: TORC1 y TORC2. TORC1 está formado por RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*) y por mLST8 (*mammalian Lethal with SEC Thirteen 8*). TORC2 está formado por RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), SIN1 (*SAPK-Interacting 1*) y mLST8 (Shimobayashi and Hall, 2014).

En *S. pombe* existen dos quinasas, Tor1 y Tor2, que forman parte de dos complejos, TORC2 y TORC1 respectivamente.

6.1. El complejo TORC2 de *S. pombe*

Este complejo está formado por la quinsa Tor1 y las proteínas Sin1, Ste20 (Rictor) y Wat1 (Hayashi et al., 2007; Matsuo, 2003; Otsubo and Yamamoto, 2008) (**Figura 11A**).

El complejo TORC2 participa en el desarrollo sexual, en el crecimiento en condiciones de estrés, en la captación de aminoácidos y en la adaptación a la bajada de glucosa en el medio de cultivo (Cohen et al., 2014; Kawai et al., 2001; Weisman et al., 2007; Weisman and Choder, 2001). El complejo se activa cuando hay una bajada en los niveles de nitrógeno, permitiendo la parada en G1 y el comienzo del ciclo sexual, regula la adaptación a condiciones de estrés para permitir el crecimiento y además promueve la transcripción de permeasas de aminoácidos. Las células *tor1Δ* son incapaces de pararse en G1 en respuesta a la escasez de nitrógeno en el medio, por lo que en estas condiciones son estériles (Weisman and Choder, 2001). *tor1Δ* es sensible a frío, estrés osmótico y oxidativo. Además,

la delección de cualquiera de los componentes del complejo provoca sensibilidad a KCl (Ikeda et al., 2008). Cuando TORC2 se ve inhibida, se produce un incremento de la fosforilación de Sty1 que, a través de las quinasas Plo1 y Cdc2, conduce a un aceleramiento en la entrada en mitosis (Petersen and Nurse, 2007). Además, existe interacción de Sin1 con la quinasa Sty1, lo cual conlleva una regulación coordinada de la ruta SAPK y el complejo TORC2 (Morigasaki et al., 2019).

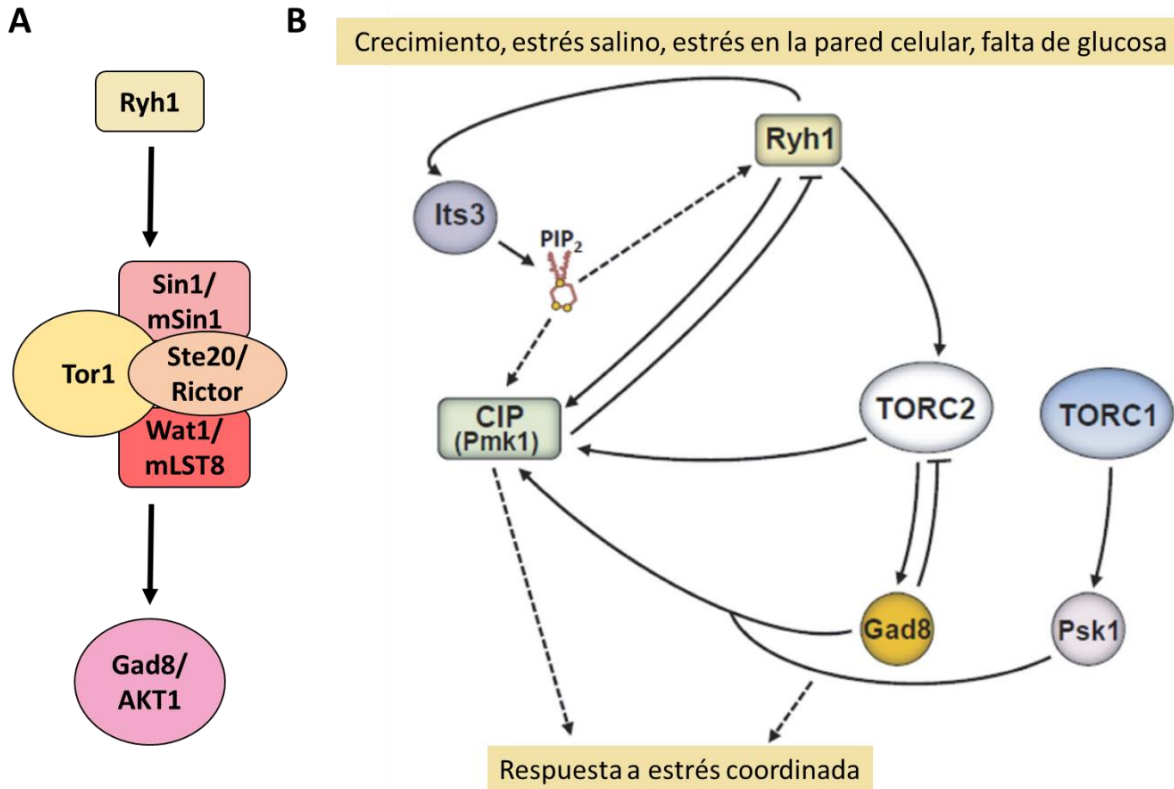


Figura 11. El complejo TORC2 de *S. pombe*. (A) Esquema de los componentes de la ruta de señalización del complejo TORC2. (B) Relación entre la ruta TOR y la ruta de integridad celular. Adaptado de Madrid et al., 2016.

6.2. Relación entre TORC2 y la ruta de integridad

Existe una relación entre las rutas de señalización mediadas por TORC2 y Pmk1 (Figura 11B; Madrid et al., 2016). Ambas rutas tienen un papel esencial en la respuesta a cambios ambientales y, por lo tanto, tiene sentido que estén funcionalmente interconectadas (Cansado et al., 2022). Por un lado, la quinasa Tor1 participa en la activación de Pmk1 en respuesta a daños en la pared celular o a una bajada en los niveles de glucosa del medio de cultivo. Además, para la activación de Pmk1 es esencial la síntesis *de novo* de Pck2, y TORC2

regula positivamente este proceso a través de su principal activador, la GTPasa Rho1 (Madrid et al., 2016). La función de TORC2 como activadora de la ruta de integridad está mediada por la quinasa Gad8, pero también participa TORC1.

Por otro lado, tanto Tor1 como Gad8 parecen tener cierto papel en el transporte o en el anclaje a la MP de las proteínas Rho1 y Rho2, activadoras de la ruta de integridad. Además, TORC2 regula la síntesis de Pck2 para activar la ruta de integridad en presencia de daños en la pared celular o en ausencia de glucosa (Madrid et al., 2014).

Por último, cabe destacar que tanto TORC2 como la ruta de integridad son necesarias para una respuesta coordinada a estrés.

7. Relación entre el tráfico vesicular y la señalización

El tráfico vesicular y las rutas de señalización mantienen una regulación cruzada, contribuyendo a la adaptación y la integridad de la célula. Las vesículas median el intercambio de proteínas entre orgánulos, pero también el intercambio de lípidos, algunos de los cuales confieren identidad a las diferentes membranas y aseguran la correcta direccionalidad del transporte (Johansen et al., 2012; Leonard et al., 2023; Odorizzi et al., 2000). Además, los lípidos influyen en las rutas de señalización porque interactúan con sensores y enzimas asociadas a membrana. Esta interacción determina su localización y tiene un impacto en su función al proporcionar un entorno adecuado (Sunshine and Iruela-Arispe, 2017).

Por otro lado, las proteínas reguladoras de las rutas de señalización, tales como las GTPasas, pueden modificar y regular a proteínas que participen en el tráfico y en la homeostasis lipídica. En particular, el Golgi y los endosomas son considerados plataformas de señalización porque acogen componentes de diversas rutas de señalización y participan en su actividad, lo cual modula el tráfico de acuerdo con las necesidades de la célula (Cancino et al., 2013; Cancino and Luini, 2013).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El exómero es un complejo proteico tradicionalmente relacionado con el transporte de proteínas transmembrana desde el TGN hasta la MP. Sin embargo, algunos resultados sugieren que podría tener funciones adicionales. Algunos fenotipos de los mutantes del exómero, como alteraciones en la polaridad o sensibilidad a iones e higromicina, no se han podido adscribir a la retención en el Golgi de ninguna proteína transmembrana implicada en esos procesos (Anton et al., 2017; Hoya et al., 2017; Trautwein et al., 2006).

En el caso de *S. pombe* no se ha encontrado ninguna proteína transmembrana, implicada en ninguno de los procesos estudiados, que se quede retenida en el TGN o se deslocalice en ausencia del exómero (Hoya et al., 2017). Esto potencia la idea de que en este organismo el exómero no es un adaptador de cargo clásico. Además, el hecho de que coopere tanto con AP-1 en el tráfico anterógrado a la MP, como con los GGAs en el tráfico hacia el PVE (Hoya, 2017) sugiere que podría participar en un proceso más general del tráfico vesicular que lo que correspondería a un adaptador específico de *cargo*. Esta cooperación también se ha descrito en *S. cerevisiae* (Anton-Plagaro et al., 2021), lo que sugiere que en la levadura de gemación el exómero podría tener una función de adaptador (la más caracterizada) y otra función más general.

El hecho de que los mutantes carentes del exómero (*cfr1Δ* y *bch1Δ*) tengan varios fenotipos, aparentemente no relacionados, pero que ninguno de ellos sea muy penetrante apoya la idea de que el exómero de *S. pombe* pueda participar en algún proceso general, que afecte a varias funciones biológicas sin ser esencial para ninguna de ellas. Además, también estaría de acuerdo con el hecho de que en rastreos de 2-híbridos realizados usando Cfr1 o Bch1, prácticamente sólo se obtenga con el otro componente del exómero (nuestros resultados, y (Vo et al., 2016), y en rastreos tipo SGA o de proteómica no se hayan encontrado, de manera reproducible, genes/proteínas que participen en un proceso determinado.

En resultados anteriores del laboratorio los mutantes del exómero de *S. pombe* presentaron defectos leves en: fusión celular durante la conjugación, tráfico de la carboxipeptidasa Y, composición de la pared celular, crecimiento en presencia de caspofungina, tunicamicina, DTT, higromicina, y algunas sales, y septación en presencia de KCl y sorbitol (Cartagena-

Lirola et al., 2006; Hoya, 2016; Hoya et al., 2017; Moro, 2018; Moro et al., 2021). De entre la sensibilidad a sales, cabe destacar sensibilidad a CaCl_2 y a sales de K^+ . En particular los mutantes son sensibles a KCl 0,6 M, KNO_3 0,6 M y acetato de potasio 0,02 M. Sin embargo, los mutantes crecen bien en presencia de sorbitol 1,2 M, un medio con una osmolaridad similar a la de KCl 0,6 M (Moro et al., 2021), lo que indica que la ausencia del exómero provoca sensibilidad a estrés iónico pero no a estrés osmótico. Además, el sorbitol no mejora el crecimiento en presencia de KCl , y las células mutantes son capaces de recuperar su crecimiento normal al pasar de medio con KCl a medio sin KCl . Esto indica que la sensibilidad a KCl no es consecuencia de la lisis celular provocada por las alteraciones en la pared celular del mutante (Hoya et al., 2017; Moro et al., 2021).

Además, los resultados iniciales obtenidos en el laboratorio indicaron que la ausencia del exómero provoca una activación anómala de la ruta de integridad celular. Un análisis inicial de la localización de Rgf1, una GEF de Rho1 y componente de la ruta de integridad, indicó que esta proteína se localiza en la superficie celular en las cepas WT y *cfr1Δ*, se deslocaliza tras 15 minutos de tratamiento con KCl y vuelve a recuperar su localización en la superficie celular en una cepa WT, pero es incapaz de hacerlo en la cepa mutante del exómero (Moro, 2018).

También se vio que en condiciones de estrés iónico el sistema endosomal de las células mutantes del exómero tiene una morfología alterada, lo cual podría contribuir a los diversos fenotipos leves relacionados con el transporte vesicular y la homeostasis iónica que presentan estas células (Moro et al., 2021).

Teniendo esto en cuenta, y con el fin de conseguir información que ayude a conocer la posible función general del exómero en el tráfico vesicular, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Analizar con más detalle el papel del exómero en la regulación de la homeostasis iónica del K^+ y el Ca^{2+} .
2. Averiguar cómo regula el exómero a la ruta de integridad celular.

RESULTADOS

1. El papel del exómero en la homeostasis iónica y la secreción polarizada

1.1. Los mutantes del exómero acumulan iones K⁺

Como se ha indicado en “Antecedentes”, los mutantes del exómero son sensibles a KCl 0,6 M, nitrato de potasio (KNO₃) 0,6 M y acetato de potasio (CH₃CO₂K) 0,02 M. Por otro lado, los mutantes crecen bien en presencia de sorbitol 1,2 M. Estos resultados demostraron que *cfr1Δ* era sensible a KCl debido a una sensibilidad a K⁺, pero no a cloruro o a alta osmolaridad. Por otro lado, la presencia de sorbitol no mejora el crecimiento en presencia de KCl en placas suplementadas con KCl 0,6 M y sorbitol 0,6 M. Además, las células mutantes recuperan su capacidad de crecimiento al pasar de un medio con KCl a otro medio sin KCl (Moro et al., 2021). Esto refuta la hipótesis de que la sensibilidad a potasio es consecuencia de la lisis celular provocada por los pequeños defectos en la pared celular de los mutantes del exómero (Hoya et al., 2017).

El transporte de iones y el de aminoácidos están relacionados entre sí (Bossi et al., 1999; Brown and Sepulveda, 1985), y los mutantes del exómero de la levadura de gemación tienen un defecto en la captación de triptófano (Anton-Plagaro et al., 2021). Además, *cfr1Δ* y *bch1Δ* presentan defectos en el tráfico hacia el PVE/vacuolas, que son orgánulos importantes para la homeostasis de los aminoácidos (Hoya et al., 2017; Lawrence and Zoncu, 2019). Consecuentemente, para entender si la presencia de K⁺ producía un defecto en la homeostasis o la captación de aminoácidos, que pueda estar incrementado en mutantes del exómero y resultar en defectos en el crecimiento de cepas auxótrofas, analizamos el crecimiento de cepas WT y *cfr1Δ* protótrofas en placas de YES con KCl 0,6 M. Observamos que el mutante también era sensible a KCl en estas condiciones de crecimiento (**Figura 12A**).

Además, para investigar más específicamente si los mutantes del exómero presentaban una alteración en la homeostasis del K⁺, determinamos el contenido intracelular de este ion en células WT y *cfr1Δ* en colaboración con J.M. Mulet (Universidad Politécnica de Valencia). Los resultados mostraron que este contenido era significativamente mayor en el mutante

del exómero que en el WT (**Figura 12B**), lo cual confirma que el exómero juega un papel importante en la regulación de la homeostasis del potasio.

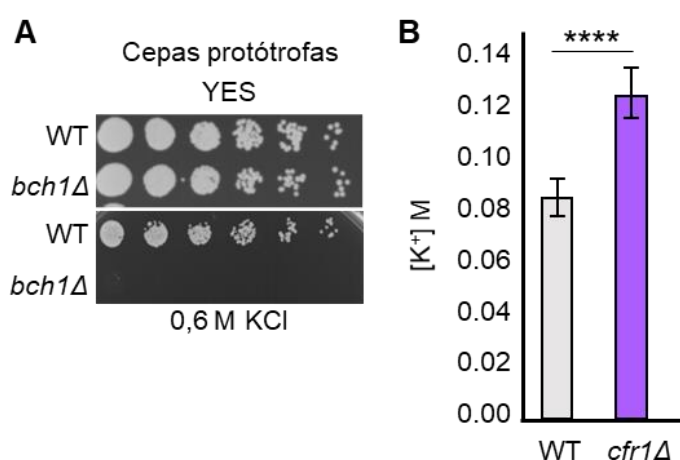


Figura 12. Los mutantes del exómero son sensibles a K⁺ e hiperacumulan este ion. (A) Cepas protótrofas *wild-type* (WT) y *bch1Δ* se sembraron en YES y YES con KCl 0,6 M, y se incubaron a 32°C dos días. (B) Concentración intracelular de K⁺ (M) en las cepas WT y *cfr1Δ*. Para cada valor, se muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, así como la significancia estadística de la diferencia, determinada utilizando la prueba *t*. ****, *p* < 0,0001.

1.2. Los mutantes del exómero presentan interacción genética con mutantes en transportadores y canales de K⁺

Dado que, en principio, la función del exómero es facilitar el tráfico de proteínas transmembrana desde el TGN hacia la MP, investigamos si este complejo podría estar involucrado en el tráfico de algún transportador/canal de K⁺. Los mutantes de los transportadores de potasio mejor caracterizados en *S. pombe*, *trk1+* y *trk2+*, presentan defectos en su crecimiento en condiciones limitantes de K⁺ (Calero et al., 2000, 2004). Este es un fenotipo diferente al de los mutantes del exómero, pero cabía la posibilidad de que la retención de Trk1 y/o Trk2 en el Golgi pudiera aumentar la captación de K⁺ por otros transportadores menos específicos, y producir su acumulación intracelular. Por lo tanto, comparamos el crecimiento de *trk1Δ* y *trk2Δ* con el de *cfr1Δ* en presencia de sales de K⁺. Además, construimos mutantes dobles y triples para determinar si *cfr1+* actuaba en la misma ruta funcional que *trk1+* y/o *trk2+*. Los resultados mostraron que, mientras que *cfr1Δ* era sensible a sales de potasio, ni *trk1Δ*, *trk2Δ*, ni *trk1Δ trk2Δ* (denominado *trkΔΔ* en la **Figura 13A**) lo eran. En cuanto a los dobles mutantes, *trk1Δ cfr1Δ* era más sensible que *cfr1Δ*, lo que indica que ambos genes cooperan y actúan en paralelo en lugar de en una ruta lineal en relación con la sensibilidad a K⁺. En cambio, la delección *trk2Δ* suprimía parcialmente el defecto en el crecimiento de *cfr1Δ* en presencia de sales de potasio, lo que

indica que ambos genes juegan papeles antagónicos. El fenotipo de *trk1Δ trk2Δ cfr1Δ* (denominado *trkΔΔ cfr1Δ* en la **Figura 13A**) era similar al de *trk2Δ cfr1Δ*.

Los resultados anteriores sugieren que hay una relación funcional compleja entre *trk1+*, *trk2+* y *cfr1+* y, a priori, descartan la hipótesis de que la sensibilidad a K⁺ de *cfr1Δ* se pudiera deber a la retención en el TGN de Trk1 y/o Trk2. Aun así, para obtener información directa sobre esta hipótesis, fusionamos Trk1 y Trk2 a la GFP para analizar su localización. GFP-Trk1 se localizaba en la superficie celular de los sitios de crecimiento activo de la célula (polos y septo) en las cepas WT y *cfr1Δ* (**Figura 13B**), en presencia y ausencia de KCl. Esto demostraba que Trk1 tiene una localización normal en ausencia del exómero. Además, tanto la observación al microscopio como un análisis por western blot mostraron que la cantidad de GFP-Trk1 era similar en ambas cepas (**Figura 13C**). Por razones desconocidas, ni Trk2-GFP ni GFP-Trk2 mostraron señal de fluorescencia. Sin embargo, el hecho de que *trk2Δ* suprima parcialmente la sensibilidad de *cfr1Δ* indica que la razón de esta sensibilidad no es la ausencia de Trk2 en la superficie celular. De hecho, este resultado sugiere que Trk2 podría mediar la captación de K⁺ en *cfr1Δ*, al menos parcialmente.

Para determinar la participación del exómero en la regulación de otros transportadores hipotéticos de K⁺, analizamos el fenotipo de *osr2Δ* (anotado en la PomBase como un ortólogo de la proteína humana KCNAB1-3, un “Canal de potasio, subunidad β”) y el fenotipo de *kha1Δ* (anotado como un antiportador de protones/iones K⁺ de membrana, ortólogo de *KHA1* de *S. cerevisiae*). También analizamos la interacción génica entre *osr2+*, *kha1+* y *cfr1+*. Los resultados demostraron que ni *osr2Δ* ni *kha1Δ* eran sensibles a sales de K⁺ y que el fenotipo de los correspondientes dobles mutantes era similar al del mutante simple *cfr1Δ* (**Figura 13D**). Finalmente, analizamos el crecimiento en presencia de KCl 1 M de las cepas de la colección de *S. pombe* “Genome-wide Deletion Mutant Library” (Bioneer, United States), con deleciones en genes anotados como canales/transportadores iónicos. Ninguna de las cepas resultó ser igual de sensible que *cfr1Δ* (**Anexo I-1**).

En resumen, todos estos resultados sugieren que la sensibilidad de los mutantes del exómero a sales de potasio no es consecuencia (al menos no exclusivamente) de un defecto en el tráfico hacia la membrana de canales/transportadores iónicos.

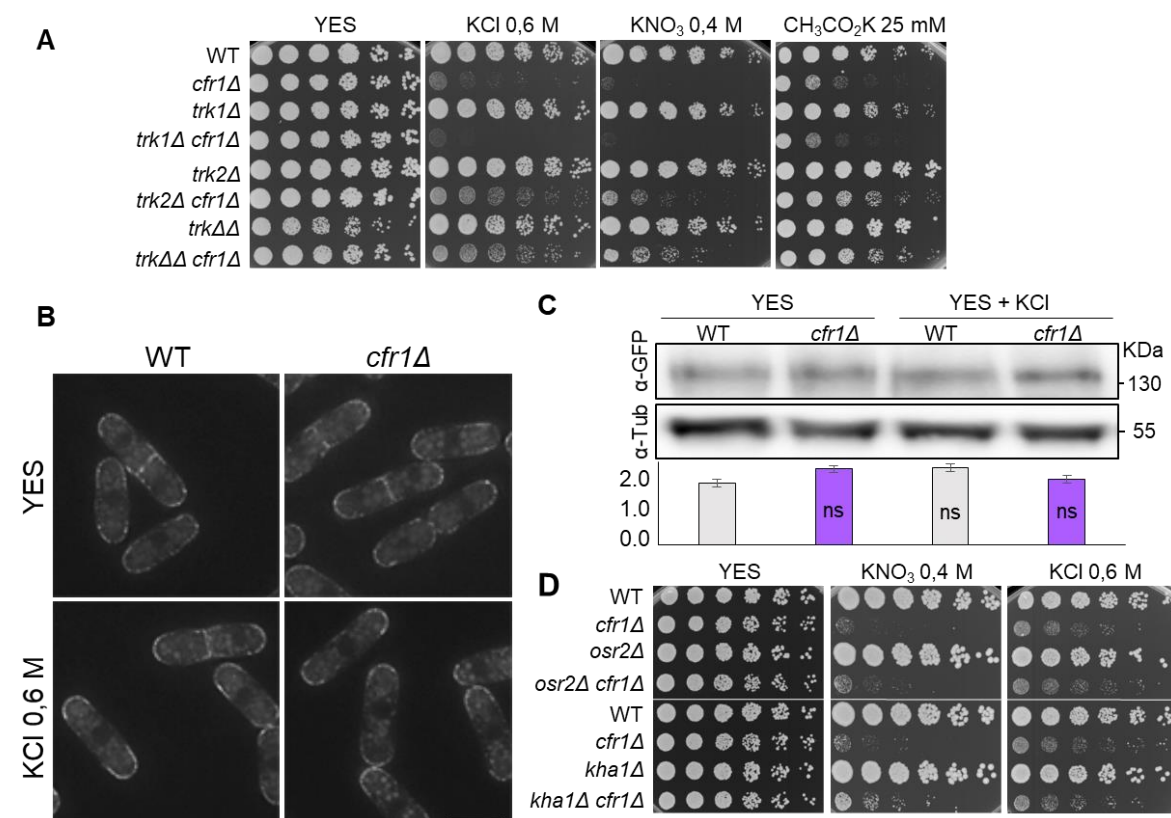


Figura 13. Relación entre el exómero y los transportadores Trk en presencia de sales de potasio. (A) Células de las cepas indicadas se sembraron en YES y en YES suplementado con las concentraciones indicadas de sales de potasio, y se incubaron a 32°C dos días. WT, *wild-type*; *trkΔΔ*, *trk1Δ trk2Δ*. **(B)** Imágenes de células WT y *cfr1Δ* que expresaban GFP-Trk1 creciendo exponencialmente en YES y YES con KCl 0,6 M, adquiridas en un sistema DeltaVision. Barra de escala, 10 μm. **(C)** Extractos celulares de las cepas indicadas que expresan GFP-Trk1, incubadas en YES y YES con KCl 0,6 M, fueron sometidos a SDS-PAGE e inmunodetectados con anticuerpos anti-GFP (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior, control de carga). La posición relativa de los marcadores de peso molecular se indica a la derecha (kDa). La intensidad de cada banda de GFP-Trk1 se relativizó con el valor de la correspondiente banda de tubulina, y todos los valores se relativizaron respecto al valor del WT cultivado en YES. Para cada valor, se muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, así como la significancia estadística de la diferencia, determinada utilizando el test de comparaciones múltiples de Tukey después de ANOVA. ns, no significativo. **(D)** Células de las cepas indicadas se inocularon en YES y YES suplementado con las concentraciones indicadas de sales de potasio.

1.3. Hiperpolarización de la membrana plasmática en mutantes del exómero

Una actividad alta de la ATPasa de la MP extrae protones del interior celular a un ritmo elevado, consiguiendo una hiperpolarización de la MP, que induce la captación de iones (K^+ , Na^+ , Li^+ y Ca^{2+}) y algunos compuestos tóxicos como la higromicina B (HygB; Calero et al., 2000; Madrid et al., 1998; Mulet et al., 1999). Por tanto, para entender si la acumulación de K^+ en los mutantes del exómero estaba relacionada con una actividad alta de la ATPasa, cuantificamos dicha actividad en cepas WT y *cfr1Δ* en colaboración con J.M. Mulet. Los datos obtenidos demostraron que esta actividad estaba significativamente incrementada en el mutante (**Figura 14A**), y comprobamos mediante western blot que este aumento en la actividad no era consecuencia de una mayor cantidad de la proteína Pma1 (**Figura 14B**).

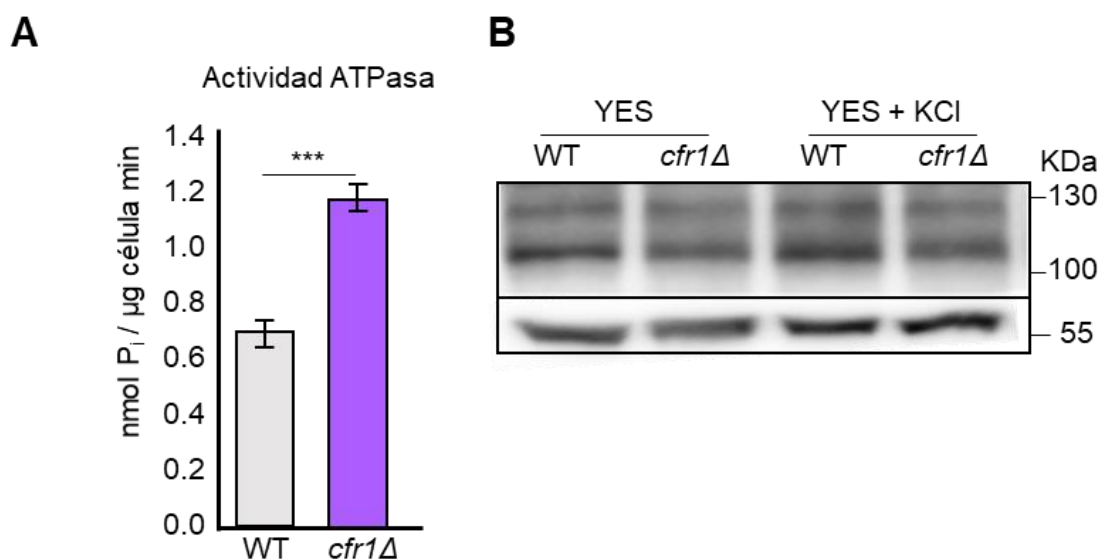


Figura 14. Análisis de la ATPasa de membrana en mutantes del exómero. (A) Análisis de la actividad ATPasa (nmol P_i /μg célula minuto) en extractos de células WT y *cfr1Δ*. Para cada valor, se muestra la media de tres experimentos independientes, la desviación estándar y la significancia estadística de la diferencia determinada utilizando la prueba *t*. ***, $p < 0,001$. **(B)** Extractos celulares de las cepas WT y *cfr1Δ*, incubadas en YES y en YES con KCl 0,6 M, fueron sometidos a SDS-PAGE e inmunodetectados con anticuerpos policlonal anti-Pma1 de *S. cerevisiae* (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior; control de carga). La posición relativa del marcador de peso molecular se indica a la derecha (kDa).

Para confirmar que este aumento en la actividad ATPasa tenía un efecto en la fisiología de las células mutantes y para continuar con la caracterización de la sensibilidad a K^+ , investigamos si la MP estaba hiperpolarizada en los mutantes del exómero. La

hiperpolarización de la membrana y la retención intracelular de K^+ han sido descritas anteriormente en el mutante *trk1Δ trk2Δ* en determinadas condiciones (Mulet et al., 1999). Por tanto, comparamos la sensibilidad a HygB de mutantes simples de delección de *cfr1+*, *trk1+* y *trk2+*. También se analizaron los mutantes dobles y triple (**Figura 15A**). Los resultados mostraron que *cfr1Δ* era parcialmente sensible a HygB y que deleccionar *cfr1+* aumentaba la sensibilidad de las cepas *trk1Δ*, *trk2Δ* y *trk1Δ trk2Δ* (**Figura 15A**). La sensibilidad a HygB, junto con el hecho de que suplementar el medio con KCl 0,4 M mejoraba el crecimiento en presencia del antibiótico, concuerda con un escenario de hiperpolarización de membrana. Además, el antibiótico mejoraba el crecimiento de *cfr1Δ* y *trk1Δ cfr1Δ* en presencia de concentraciones altas de KCl. A continuación, analizamos el crecimiento en presencia de otros iones (**Figura 15B**). Los resultados mostraron que *trk1Δ* era parcialmente sensible a NaCl 40 mM y sensible a $CaCl_2$ 100 mM; *trk2Δ* crecía bien en todas las condiciones, y *trk1Δ trk2Δ* era la más sensible de todas las cepas. *cfr1Δ* sólo era sensible a concentraciones muy altas de Na^+ y Ca^{2+} (paneles inferiores en **Figura 15B**) e introducir la mutación *cfr1Δ* no aumentaba la sensibilidad de ningún mutante *trkΔ*. En cuanto al crecimiento en placas suplementadas con litio, *trk1Δ* era parcialmente sensible a LiCl 1 mM y *trk1Δ trk2Δ* era muy sensible (**Figura 15C**). En contraste, *cfr1Δ* era resistente incluso a LiCl 2 mM, una concentración que reducía el crecimiento del WT, y la delección de *cfr1+* mejoraba el crecimiento de *trk1Δ* en LiCl 1 mM.

En resumen, el aumento de la actividad protón ATPasa, la sensibilidad de *cfr1Δ* a HygB y su supresión por KCl 0,4 M apoyan fuertemente la hipótesis de una MP hiperpolarizada en los mutantes del exómero. Sin embargo, la leve sensibilidad a NaCl y la resistencia a LiCl sugieren que esta hiperpolarización no es muy fuerte y podría no explicar por sí misma la sensibilidad a potasio de los mutantes del exómero.

1.4. La distribución de la bomba de extrusión de K^+ Cta3 es anómala en los mutantes de exómero

Los mutantes *cfr1Δ* acumulan K^+ intracelular y no pudimos identificar un defecto evidente en ningún transportador/canal, lo cual nos llevó a investigar la posibilidad de que los

mutantes tuvieron defecto en la extrusión de K^+ . Los represores *tup11+* y *tup12+* regulan la expresión de la ATPasa de extrusión Cta3 en respuesta a estrés iónico pero no osmótico (Benito et al., 2002; Greenall et al., 2002; Nishikawa et al., 1999).

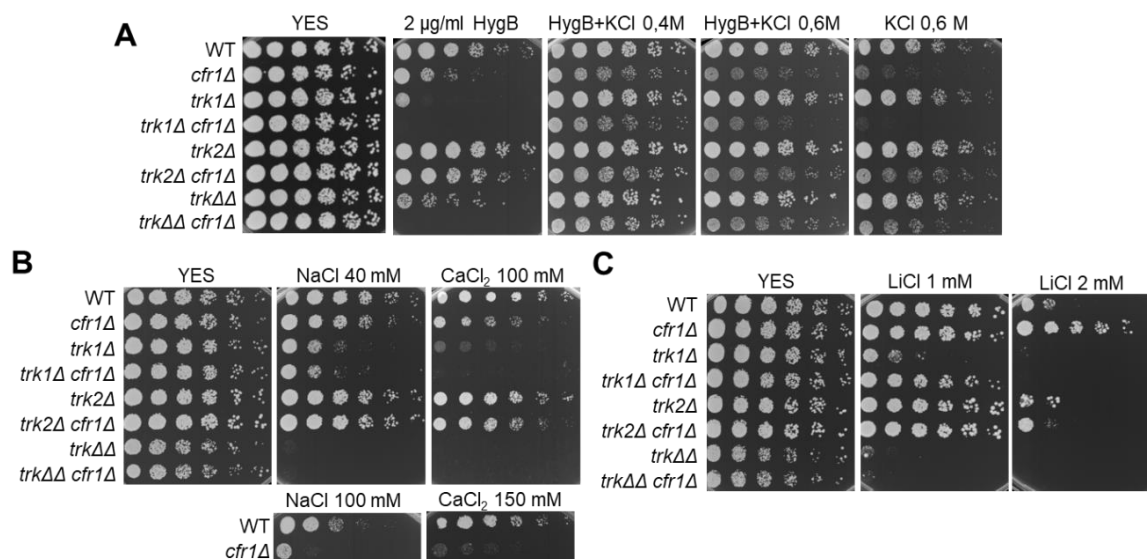


Figura 15. Sensibilidad iónica de mutantes de transportadores y del exómero. (A) Células de las cepas indicadas se cultivaron en YES y YES suplementado con HygB 2 µg/ml, HygB con KCl, y KCl sin HygB. WT, wild-type; *trkΔΔ*, *trk1Δ trk2Δ*. (B) Los mismos detalles experimentales que en (A), pero las células se cultivaron en placas de YES suplementadas con diferentes cantidades de NaCl y CaCl₂. Los paneles inferiores muestran el crecimiento de las cepas WT y *cfr1Δ* en placas suplementadas con concentraciones altas de los mismos compuestos. (C) Los mismos detalles experimentales que en (B), pero las células se cultivaron en placas de YES suplementadas con diferentes cantidades de LiCl.

Comparamos el crecimiento de los mutantes del exómero en KCl y KNO₃ con el de *cta3Δ* y el doble mutante en fondos *tup11+* *tup12+* y *tup11Δ tup12Δ* (Figura 16A). Descubrimos que la delección simultánea del exómero y *cta3+* conlleva una sensibilidad a bajas concentraciones de KCl y KNO₃, tanto en presencia como en ausencia de los represores, mientras que *cta3Δ* sólo era sensible a KCl 0,6 M en el fondo *tup11Δ tup12Δ*. Estos resultados descartan, a priori, un defecto en la transcripción de *cta3+* en los mutantes. Como Cta3 se describió originalmente como una bomba de Ca²⁺ dependiente de ATP (Ghislain et al., 1990; Halachmi et al., 1992), también analizamos el crecimiento en placas de CaCl₂ y observamos que *cta3Δ* sólo era sensible a concentraciones altas de calcio, y exclusivamente en ausencia de los reguladores Tup. Bajo estas condiciones, *cta3Δ bch1Δ* era sensible a concentraciones de calcio más bajas. En conjunto, estos resultados muestran que existe interacción génica entre el exómero y Cta3 para una función que parece más

específica para el crecimiento en presencia de potasio que en estrés por calcio. Atendiendo al crecimiento en presencia de HygB, *cta3Δ* no era sensible, y *cta3Δ cfr1Δ* (denominado $\Delta\Delta$ en la **Figura 16B**) era tan sensible como *cfr1Δ*. El crecimiento de *cfr1Δ* en presencia del antibiótico mejoraba añadiendo al medio KCl 0,4 M. Curiosamente, *cta3Δ cfr1Δ* no crecía en medio con KCl 0,4 M ni en KCl 0,4 M con HygB.

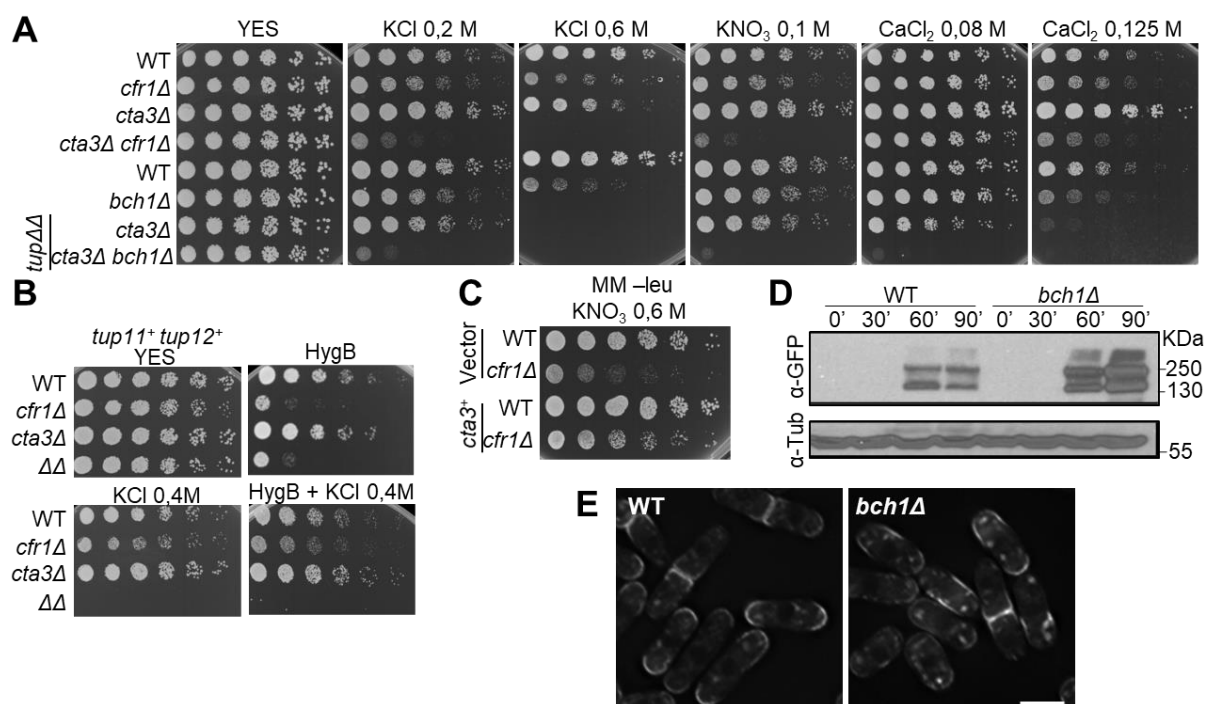


Figura 16. Relación entre el exómero y la bomba de exporte de K⁺ Cta3. (A) Células de las cepas indicadas fueron cultivadas en YES y YES suplementado con los compuestos indicados. *tupΔΔ* indica que las cepas *cta3Δ* y *cta3Δ bch1Δ* crecidas en la parte baja de la placa llevan las deleciones *tup11Δ* y *tup12Δ*. (B) Los mismos detalles experimentales que en (A), pero las células fueron inoculadas en YES y YES suplementado con KCl 0,4 M, HygB 2 μg/ml, y KCl 0,4 M con HygB 2 μg/ml. WT, wild-type; $\Delta\Delta$, *cta3Δ bch1Δ*. (C) Células WT y *cfr1Δ* portadoras de un vector vacío o un plásmido integrativo que permite la expresión de *cta3+* a partir del promotor *nmt1+* crecidas en medio mínimo sin leucina (MM-leu) suplementado con KNO₃ e incubadas a 32°C durante 5 días. (D) Extractos celulares de las cepas WT y *bch1Δ* portadoras de la construcción Cta3-GFP, incubadas en YES antes de añadir KCl 0,6 M, fueron sometidas a SDS-PAGE e inmunodetectadas con los anticuerpos anti-GFP monoclonal (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior; control de carga). Los minutos indican el tiempo de incubación con KCl 0,6 M. La posición relativa de los marcadores de peso molecular está indicada a la derecha (kDa). (E) Imágenes de células WT y *bch1Δ* portadoras de Cta3-GFP después de 1 h de incubación con KCl 0,6 M. Las imágenes se capturaron con un sistema DeltaVision. Barra de escala, 10 μm.

Estos datos sugerían que la bomba de extrusión era necesaria para la mejora del crecimiento en presencia de sal y antibiótico y/o que la ausencia del exómero y la bomba de extrusión provocaba una acumulación de K⁺, que era deletérea para las células.

Razonamos que si la fuerte sensibilidad a K^+ en el doble mutante fuese consecuencia de una hiperacumulación de este ion, la sobreexpresión de *cta3+* debería tener el efecto contrario. Para probar esta hipótesis, sobreexpresamos *cta3+* en cepas WT y *cfr1Δ*, y comprobamos su crecimiento en placas con KNO_3 . El resultado mostraba que la sobreexpresión de la bomba de extrusión aliviaba el defecto en el crecimiento de *cfr1Δ* en presencia de altas concentraciones de K^+ (**Figura 16C**). Estos resultados demostraban una relación funcional entre el exómero y Cta3, que estaba relacionada con una extrusión defectuosa de K^+ en el mutante del exómero.

A continuación, intentamos entender la relación entre el exómero y Cta3. Utilizamos la técnica western blot para determinar si *cta3+* estaba siendo regulado adecuadamente en respuesta a potasio en los mutantes del exómero. En ambas cepas (WT y *bch1Δ*) Cta3-GFP se detectaba después de 60 minutos de incubación con KCl 0,6 M (**Figura 16D**), aunque en el mutante la cantidad de proteína era mayor. Atendiendo a su localización, experimentos de microscopía mostraban que 1 hora después de añadir KCl la mayoría de Cta3-GFP se acumulaba en la periferia celular de los sitios de crecimiento polarizado (polos y ecuador), y que la intensidad de fluorescencia en estas zonas era similar en células WT y mutantes (**Figura 16E**). A pesar de ello, una observación detallada mostró que la distribución de Cta3-GFP en la superficie celular era diferente en ambas cepas. En el WT, la proteína se observaba de forma simétrica en el polo de la célula y sus alrededores, además de en la zona media de la célula (**Figura 17A, WT**). En *bch1Δ*, había células cuya señal de fluorescencia a ambos lados de los polos y/o en la zona media tenían diferente longitud (distribución denominada como asimétrica), y células con fluorescencia en los polos pero no en la punta de los mismos (distribución subapical; **Figura 17A, bch1Δ**). La cuantificación del porcentaje de células con diferentes patrones de distribución de Cta3-GFP demostraba que en una cepa WT aproximadamente un 10% de las células presentaban una distribución asimétrica o subapical, mientras que este porcentaje era superior al 50% en células mutantes (**Figura 17B**). Curiosamente, las distribuciones asimétrica y subapical no se observaron después de 3 horas en KCl (**Figura 17C**). Este resultado sugiere que después de su llegada a la superficie celular, Cta3-GFP difunde a lo largo de la MP.

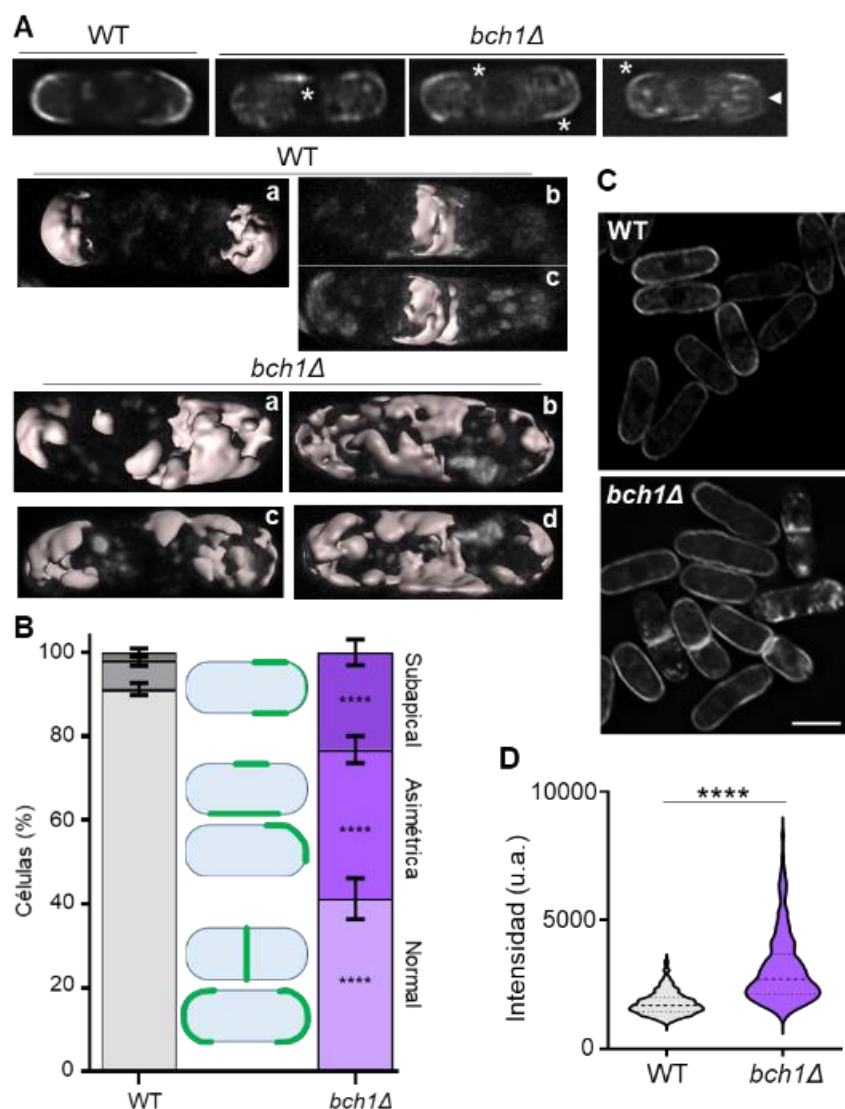


Figura 17. Análisis microscópico de Cta3. (A) Panel superior; Imágenes de células WT y *bch1Δ* portadoras de Cta3-GFP después de 1 h de incubación con KCl 0,6 M. Se muestran células con diferentes distribuciones de Cta3 en la membrana plasmática. Los asteriscos indican regiones con una distribución asimétrica de Cta3, y la flecha indica un polo celular con distribución subapical. Panel inferior; reconstrucciones tridimensionales de imágenes confocales de la distribución de Cta3-GFP en células WT y *bch1Δ* incubadas en KCl durante 1 h. Para el WT, se muestran células con distribución simétrica de Cta3 en los polos celulares (a) y en la zona central (b y c). Para *bch1Δ*, se muestran células con distribución anómala en los polos celulares (a y c) y en la zona central (b y d). (B) El gráfico representa el porcentaje de células WT y *bch1Δ* con diferentes patrones de distribución de Cta3. Los dibujos en el centro representan los diferentes patrones que fueron contabilizados. (C) Igual que en (A), pero las células se incubaron en KCl durante 3 h. (D) Representación de la intensidad de fluorescencia de los puntos intracelulares de Cta3-GFP en células WT y *bch1Δ* capturadas en tres experimentos independientes. u.a., unidades arbitrarias. Las imágenes en (A,C) se tomaron con un sistema DeltaVision. Barra de escala, 10 μm. Para cada valor, se muestra la media de tres experimentos independientes, y la desviación estándar y la significancia estadística de la diferencia (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001). Las diferencias estadísticas se determinaron mediante el test de comparaciones múltiples de Šidák en (A) y la prueba t en (D).

Además, parte de la fluorescencia de la proteína se observa en puntos intracelulares (**Figuras 16E, 17A**), un fenotipo que ya ha sido descrito en las proteínas Tat2 y Mup1 en ausencia del exómero de *S. cerevisiae* (Anton-Plagaro et al., 2021). Un análisis de la intensidad de fluorescencia en estos puntos de Cta3-GFP mostró que en la cepa mutante el nivel de fluorescencia era significativamente mayor que en la WT (**Figura 17D**), indicando que hay una mayor cantidad de Cta3 intracelular.

En resumen, estos resultados demuestran que el exómero es necesario para un transporte eficiente de Cta3 desde el TGN hacia la MP. Aunque la ausencia del exómero no bloquea el transporte hacia la MP, resulta en una distribución deficiente en la superficie celular, lo cual puede contribuir a la sensibilidad a K^+ .

1.5. Regulación de la homeostasis del K^+ en el PVE por parte del exómero

Se sabe que el PVE tiene una morfología aberrante en los mutantes del exómero (Moro, 2018; Moro et al., 2021). Nhx1/Cpa1 es similar a *NHX1* de *S. cerevisiae*, un antiportador de Na^+ y K^+/H^+ que secuestra Na^+ y K^+ en las vacuolas/PVE, contribuyendo a la tolerancia a K^+ , y controla la fusión vacuola-cuerpo multivesicular. Además, *nhx1Δ* es sensible a concentraciones altas de K^+ e HygB (Brett et al., 2005; Gaxiola et al., 1999; Karim and Brett, 2018). Por lo tanto, analizamos la relación entre el exómero y Nhx1 de *S. pombe*. Observamos que el defecto en el crecimiento de los dos mutantes simples en KCl 0,6 M era similar, mientras que el *nhx1Δ cfr1Δ* no podía crecer a esta concentración (**Figura 18A**), lo que indica que Nhx1 ayuda a paliar los efectos negativos de la acumulación de K^+ del mutante del exómero, y que el exómero y Nhx1 actúan por mecanismos independientes. Finalmente, los mutantes del exómero no presentaban alteraciones en la distribución de Nhx1-GFP estudiada mediante microscopía, o en su cantidad mediante western blot (**Figura 18B,C**).

Estos resultados sugieren fuertemente que el papel del exómero en la regulación de la homeostasis del K^+ no se ejerce a través de Nhx1.

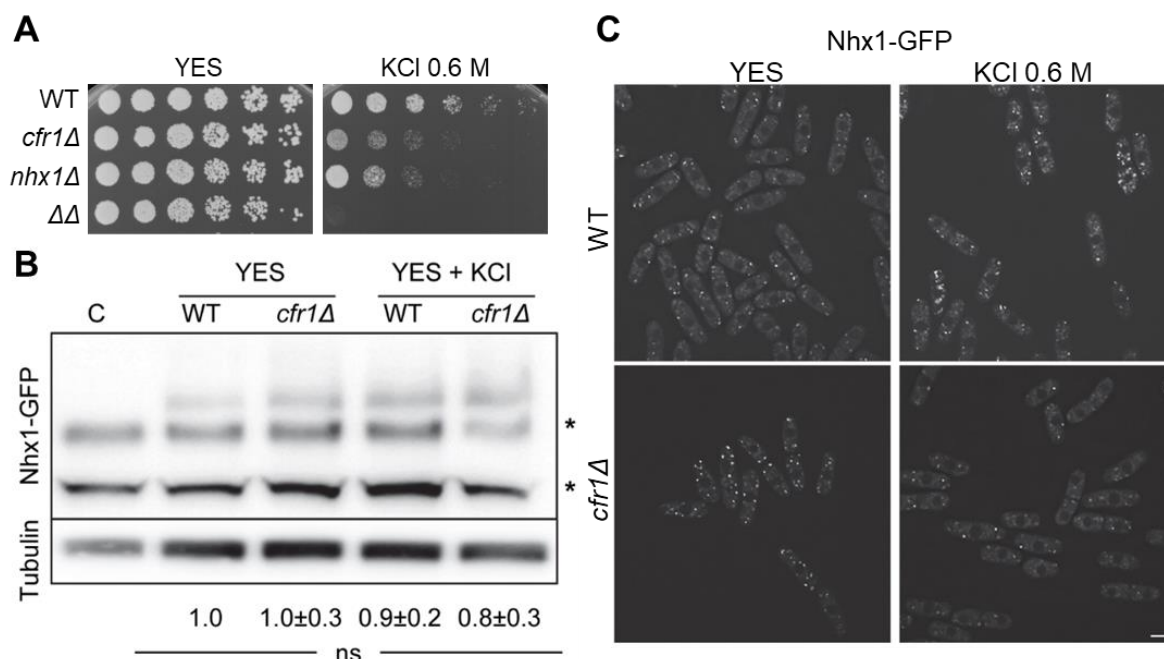


Figura 18. Relación del exómero con el transportador Nhx1. (A) Células de las cepas WT, *cfr1Δ*, *nhx1Δ* y *cfr1Δ nhx1Δ* ($\Delta\Delta$) se sembraron en placas de YES y YES con KCl 0,6 M. (B) Extractos celulares de las cepas WT y *cfr1Δ* expresando Nhx1-GFP e incubadas en YES y YES con KCl 0,6 M durante 1 hora se sometieron a SDS-PAGE y se inmunodetectaron con anticuerpos anti-GFP (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior, control de carga). En el primer carril se cargaron extractos de una cepa que no expresaba Nhx1-GFP (C) para identificar las bandas inespecíficas, que están marcadas con asteriscos. La intensidad de cada banda de Nhx1-GFP se relativizó respecto al valor de la correspondiente banda de tubulina, y todos los valores se relativizaron respecto al valor del WT crecido en YES. Para cada valor se muestra la media, la desviación estándar y la significancia estadística de la diferencia de tres experimentos independientes, determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey (ns, no significativo). (C) Las mismas condiciones experimentales que en (B), pero las células fueron fotografiadas con un sistema DeltaVision. Barra de escala, 10 μ m.

1.6. Los mutantes del exómero presentan defectos en la homeostasis del Ca^{2+} y en la distribución de Pkd2

Como el mutante *cta3Δ* tiene un defecto en la homeostasis del Ca^{2+} (Ghislain et al., 1990; Halachmi et al., 1992) y los mutantes del exómero presentan una leve sensibilidad a CaCl_2 (Figura 15A), investigamos la relación entre su sensibilidad a K^+ y la homeostasis del Ca^{2+} . Inicialmente utilizamos la activación de la calcineurina como aproximación para estimar los niveles de calcio intracelular. Determinamos mediante western blot la cantidad de GFP soluble expresada a partir de un promotor de respuesta a calcineurina (CDRE-GFP; Deng et al., 2006; Diessl et al., 2020; Kume et al., 2011; Ma et al., 2011). Como esperábamos, en el

silvestre la cantidad de GFP soluble aumentaba cuando añadíamos CaCl_2 al medio. También observamos este aumento en el mutante (panel superior en **Figura 19A**). Una observación más exhaustiva de los resultados indicó que en condiciones basales (0') la cantidad de GFP era significativamente mayor en *cfr1Δ* que en el WT, lo cual sugería una mayor cantidad de Ca^{2+} intracelular. A continuación, nos preguntamos si el K^+ tendría algún efecto en la activación de la calcineurina, por lo que añadimos KCl a los cultivos y observamos que en el WT había un incremento en la cantidad de GFP respecto al tiempo 0'. En *cfr1Δ*, donde a tiempo 0' ya había un nivel alto de GFP, este nivel no se incrementaba más (60'; panel inferior en **Figura 19A**).

Es posible que la fuerte señal de GFP detectada en el mutante en condiciones basales no nos permitiera observar un aumento. Además, la respuesta de la calcineurina a Ca^{2+} y Cl^- se regula de forma diferente (Hirayama et al., 2003). Para solventar estas consideraciones, analizamos la homeostasis del calcio tras el tratamiento con KCl utilizando un enfoque más directo y sensible. Realizamos microscopía de fluorescencia para ver los niveles de Ca^{2+} a lo largo del tiempo utilizando el indicador de calcio fluorescente GCaMP (Poddar et al., 2021). Estos experimentos se realizaron en colaboración con Qian Chen (OH, USA). Las cepas WT y *cfr1Δ* que expresaban este marcador se fotografiaron después de añadir KCl 0,6 M para examinar cómo las células respondían a este estrés. Observamos que esta sal inducía un incremento de los niveles de calcio, similar en ambas cepas hasta los 60'. Los niveles de Ca^{2+} de células silvestres presentaban un pico máximo después de 75 minutos, alcanzando un aumento del doble con respecto al nivel basal (**Figura 19B**, paneles superior y central). Sin embargo, en las células *cfr1Δ* la cantidad de Ca^{2+} continuaba creciendo durante otros 15 minutos, alcanzando un pico que era tres veces mayor que el nivel basal (**Figura 19B**, paneles superior y central). El nivel máximo de Ca^{2+} en *cfr1Δ* era un 67% mayor que en el WT. Después de alcanzar este pico, el nivel de Ca^{2+} se estabilizaba en el WT, mientras que en el mutante disminuía gradualmente durante el tiempo restante, alcanzando un nivel más bajo que el del WT. Estos resultados demuestran que tanto la respuesta inicial como la adaptación a la presencia de KCl están alteradas en ausencia del exómero. Para entender si el aumento del calcio citoplásmico era debido a una captación desde el exterior o a

movimientos de los reservorios internos, analizamos los niveles de Ca^{2+} en presencia de EGTA. Observamos que la presencia del quelante en el medio bloqueaba completamente el aumento en los niveles de Ca^{2+} tanto en las células WT como en las *cfr1Δ* (**Figura 19B**, panel inferior). En resumen, concluimos que Cfr1 modula la homeostasis del Ca^{2+} en respuesta a estrés por KCl regulando algún aspecto relacionado con la captación de Ca^{2+} extracelular.

Por lo tanto, analizamos la relación entre el exómero y las proteínas relacionadas con el transporte de calcio. Primero nos interesamos en Pkd2, el ortólogo en *S. pombe* del canal iónico de mamíferos *Transit Receptor Potencial (TRP)-like polycystic kidney-disease (P2)* (Koyano et al., 2023; Palmer et al., 2005; Sinha et al., 2022). Los canales TRP conducen iones Ca^{2+} , Na^{+} y K^{+} (Dong et al., 2010; Morris et al., 2019).

pkd2Δ es inviable, y el mutante *pkd2-81KD*, en el que *pkd2+* se encuentra bajo el control de una versión de expresión baja del promotor de *nmt1+*, es viable en medio rico y sensible a KCl 1 M y CaCl_2 (Morris et al., 2019; Palmer et al., 2005). Para entender si Pkd2 es un cargo del exómero cuyo bloqueo en el TGN pueda llevar a los fenotipos de *cfr1Δ* y *bch1Δ*, comparamos el crecimiento de *bch1Δ*, *pkd2-81KD* y el mutante doble en presencia de K^{+} y Ca^{2+} . *pkd2-81KD* (denominado *pkd2* en la **Figura 19C**) crecía mejor que *bch1Δ* en placas con potasio (KCl 0,6 M y KNO_3 0,4 M) y peor que *bch1Δ* en placas con CaCl_2 40 mM. En todos los casos, la cepa *pkd2-81KD bch1Δ* (denominada *pkd2 bch1Δ* en la figura) era la más sensible.

Aunque estos resultados indican que los fenotipos de los mutantes del exómero no se deben a un bloqueo de Pkd2 en el TGN, analizamos la distribución de Pkd2 en WT y mutantes. Observamos que Pkd2-GFP se localizaba en la superficie celular, con una fuerte acumulación en la zona del septo en ambas cepas (**Figura 20A**). No detectamos diferencias entre las cepas atendiendo a la distribución y la intensidad de fluorescencia de Pkd2-GFP en la superficie celular, ni en condiciones basales ni en KCl (**Figura 20A**). Para entender si la distribución de Pkd2 era anómala en los primeros tiempos tras la inducción con KCl, como habíamos observado con Cta3, expresamos el gen *pkd2+* a partir del promotor de *cta3+*. En estas condiciones, el porcentaje de células con una distribución de fluorescencia asimétrica o subapical era significativamente mayor en *cfr1Δ* que en el WT (**Figura 20B**).

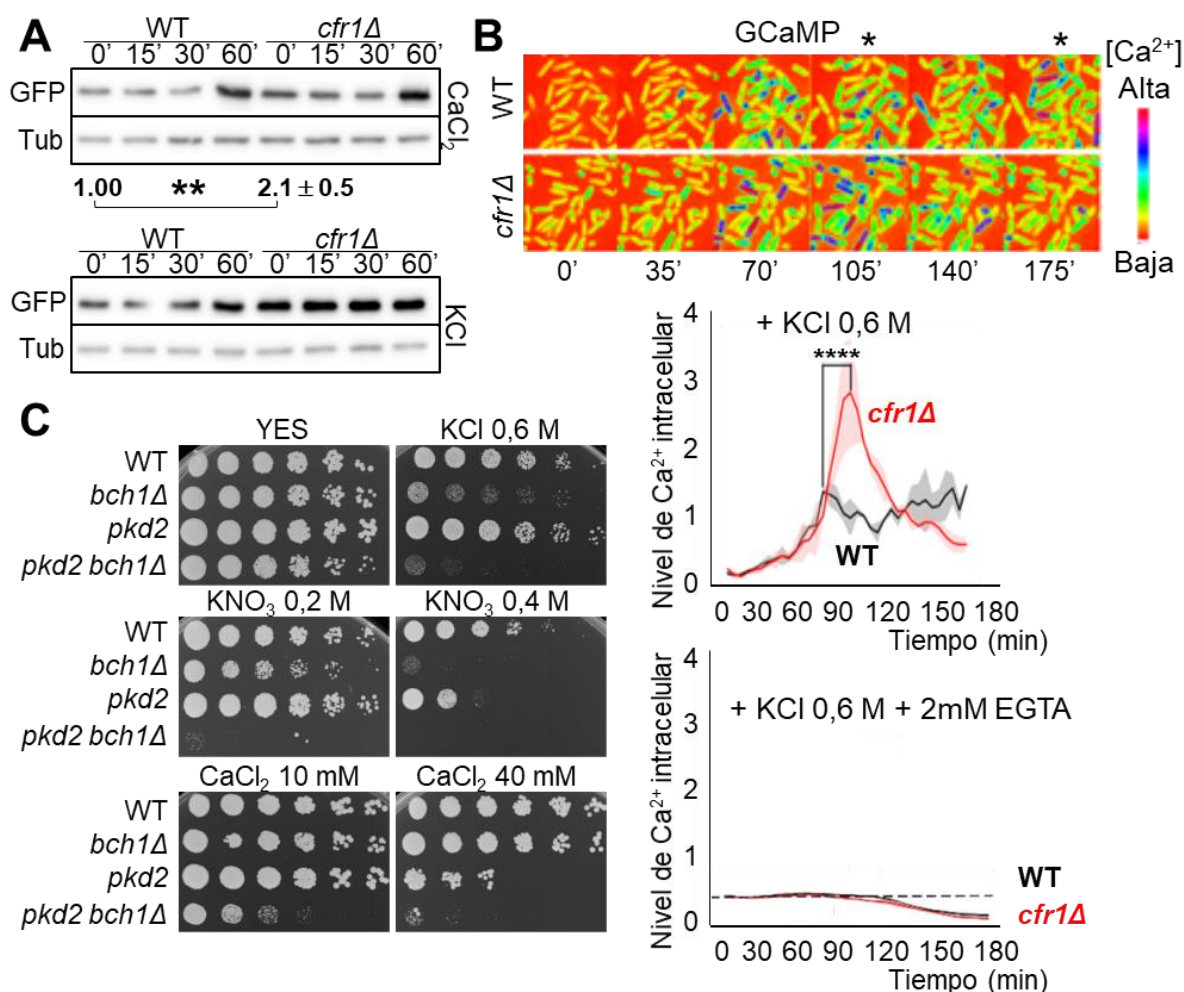


Figura 19. Relación entre el exómero y la homeostasis del calcio. (A) Panel superior, extractos celulares de las cepas WT y *cfr1Δ* que portan la construcción pCDRE-GFP tratadas con CaCl₂ 0,15 M durante los tiempos indicados (minutos). Los números debajo de las bandas indican la intensidad relativa de la relación GFP/tubulina a tiempo 0. Se realizaron tres experimentos independientes; en todos los casos, los valores del mutante fueron relativizados con respecto a los valores del WT, que fue considerado 1,00. Se indican la media, desviación estándar y significancia estadística de la diferencia para *cfr1Δ*. Panel inferior, los mismos detalles experimentales, pero las células fueron tratadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados. (B) Panel superior: imágenes a distintos intervalos de tiempo de células WT y *cfr1Δ* después de transferirlas a YES con KCl 0,6 M. Los números representan puntos temporales (minutos). Las células expresan el indicador de calcio fluorescente GCaMP6s, y el espectro de colores muestra el nivel de fluorescencia ([Ca²⁺]). Los asteriscos denotan puntos temporales en los que los niveles de calcio en *cfr1Δ* eran aparentemente diferentes de aquellos en el WT. Panel central: líneas temporales de la intensidad de fluorescencia normalizada de GCaMP6s después de añadir la sal. Las nubes representan las desviaciones estándar. Los datos representan la media de dos experimentos independientes. Panel inferior: el mismo procedimiento experimental, pero el experimento se llevó a cabo en presencia de KCl y EGTA. (C) Células de las cepas indicadas se sembraron en YES y YES suplementado con los compuestos indicados. WT, *wild-type*; *pkd2*, mutante *pkd2-81KD*. En (A) se sometieron a SDS-PAGE cantidades iguales de proteína en cada extracto celular, y se inmunodetectaron con anticuerpos anti-GFP (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior). En (A,B) la significancia estadística fue determinada utilizando la prueba t. ns, no significativo; *p < 0,05; **p < 0,01; ****p < 0,0001.

Además, existía fluorescencia intracelular de Pkd2. Todas las células presentaban una leve señal correspondiente a las vacuolas, que en *S. pombe* son pequeñas y numerosas, y algunas células presentaban al menos un punto brillante intracelular (indicado por una flecha en la **Figura 20A**). En la cepa WT menos del 20% de las células presentaban puntos intracelulares, mientras que este número era mayor del 40% en células *cfr1Δ* (**Figura 20C**). Esta diferencia era evidente en ausencia de KCl, demostrando que era producida por la ausencia del exómero. Además, los puntos eran ligeramente más brillantes en el mutante que en el control (**Figura 20D**). Mediante western blot comprobamos que esta mayor fluorescencia no se debía a unos mayores niveles de proteína (**Figura 20E**). Al contrario, una cuantificación de la cantidad de GFP libre, que normalmente sirve como aproximación para estimar la abundancia de proteínas transmembrana, mostró que había menos Pkd2-GFP en *cfr1Δ* que en el WT. Por lo tanto, el exómero regula la distribución de Pkd2, lo que puede contribuir a su papel en la regulación de la homeostasis del calcio.

Para obtener más información sobre la relación entre el exómero y la homeostasis del calcio, analizamos su interacción genética con otras proteínas implicadas en el transporte de este catión. Trp663 y Trp1322 son canales de tipo TRP (Ma et al., 2011; Morris et al., 2019), y por tanto analizamos su sensibilidad a potasio y su relación funcional con el exómero. Como se muestra en la **Figura 21A**, su delección no producía sensibilidad a KCl ni aumentaba la sensibilidad de *bch1Δ*. Por el contrario, los dobles mutantes eran más sensibles a CaCl_2 que los mutantes simples. También analizamos la relación del exómero con Pmr1 y Pmc1, que son ATPasas tipo P que participan en el transporte de calcio y se localizan en la MP y en la vacuola respectivamente (Cortés et al., 2004). *pmr1Δ* era más sensible a KCl que *cfr1Δ*, mientras que *pmc1Δ* era menos sensible que *cfr1Δ*, y los dobles mutantes eran los más sensibles (**Figura 21B**). Por tanto, existía una relación funcional entre el exómero y los transportadores de calcio, teniendo en cuenta el crecimiento en presencia de potasio. Con relación al calcio, *pmc1Δ* era parcialmente sensible a concentraciones bajas de CaCl_2 a las que *pmc1Δ cfr1Δ* era incapaz de crecer, y *pmr1Δ* era sensible a CaCl_2 100 mM mientras que *pmr1Δ cfr1Δ* no lo era, lo cual sugiere que algún proceso mediado por el exómero era deletéreo para *pmr1Δ* en presencia de calcio.

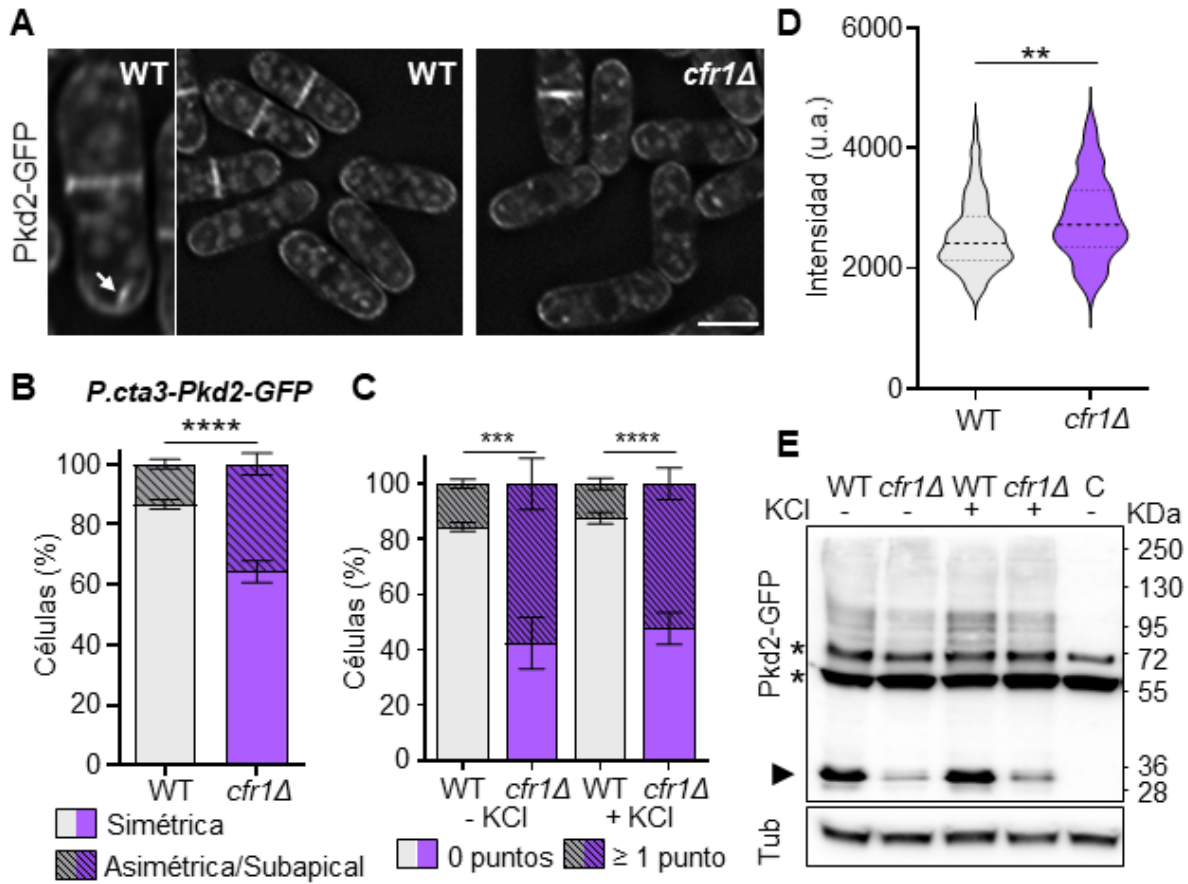


Figura 20. Análisis microscópico de Pkd2. (A) Imágenes de células WT y *cfr1Δ* con Pkd2-GFP incubadas en YES y capturadas con un sistema DeltaVision. El panel de la izquierda es un aumento de una célula WT. La flecha indica un punto intracelular de Pkd2-GFP. Barra de escala, 10 μm. (B) Análisis cuantitativo de los patrones de distribución de Pkd2-GFP en células WT y *cfr1Δ* en las que *pkd2+* se expresaba bajo el control del promotor de *cta3+*. Las células se incubaron en KCl 0,6 M durante 1 h. (C) Porcentaje de células WT y *cfr1Δ*, incubadas en YES y YES con KCl 0,6 M durante 1 h, que no mostraron puntos intracelulares de Pkd2-GFP, y que mostraron al menos un punto. (D) Representación de la intensidad de fluorescencia de los puntos intracelulares de Pkd2-GFP en células WT y *cfr1Δ* incubadas en KCl 0,6 M durante 1 h. (E) Extractos celulares de las cepas indicadas que expresan Pkd2-GFP incubadas en YES y YES con KCl 0,6 M. El último carril de la derecha (C) corresponde a extractos de una cepa sin GFP, utilizada para determinar las bandas inespecíficas, que están marcadas con asteriscos. La punta de flecha indica la GFP libre. Cantidades iguales de proteína en cada extracto celular se sometieron a SDS-PAGE y se inmunodetectaron con anticuerpos anti-GFP (panel superior) y anti-tubulina (panel inferior, Tub, control de carga). En (C,E), las células se incubaron en YES (KCl -) y en YES con KCl 0,6 M (KCl +) durante 1 h. Para cada valor, se muestran la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes, así como la significancia estadística de la diferencia determinada utilizando la prueba *t* (D), el test de comparaciones múltiples de Šidák (B,C) y el test de comparaciones múltiples de Tukey (E). ns, no significativo; ***p* < 0,01; ****p* < 0,001; *****p* < 0,0001.

En conjunto, estos experimentos demuestran que la homeostasis del calcio está alterada en los mutantes del exómero, y sugieren que algunos pequeños defectos en el transporte de Pkd2 podrían contribuir a esta alteración. Además, sugieren que el exómero y los mecanismos que gobiernan la homeostasis del calcio actúan en paralelo para permitir a la célula crecer bajo estrés por K^+ .

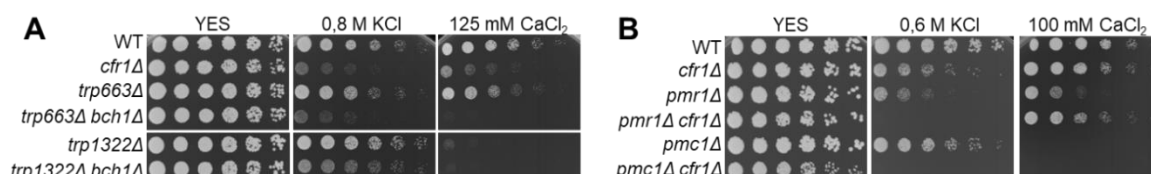


Figura 21. Análisis de otros canales de Ca^{2+} . (A) Células de las cepas indicadas se cultivaron en YES y YES suplementado con los compuestos indicados a 32°C durante 2 días. (B) Los mismos detalles experimentales que en (A).

1.7. Fenotipo de los mutantes defectuosos en clasificación de proteínas en el TGN

El fenotipo observado en los mutantes del exómero podría no ser específico de la ausencia de este complejo, sino común en todos los mutantes defectivos en clasificación de proteínas en el TGN. Para investigar esta posibilidad, analizamos el crecimiento de mutantes de delección de adaptadores de clatrina que facilitan el transporte de proteínas hacia la MP (*apm1Δ*), PVE (*ent3Δ*, *gga21Δ*, *gga22Δ* y *gga21Δ gga22Δ*) y la vacuola (*apm3Δ*) en presencia de sales de K^+ y Ca^{2+} , sorbitol, HygB y KCl con HygB. Los resultados fueron que *apm1Δ*, *gga22Δ* y *gga21Δ gga22Δ* (denominado *ggaΔΔ* en la **Figura 22**) eran sensibles a concentraciones altas de sales de K^+ y a sorbitol (**Figura 22**), lo cual demuestra que tienen problemas para crecer bajo estrés osmótico. Además de *cfr1Δ*, el único mutante sensible a acetato de potasio fue *gga22Δ*, que fue el único mutante que creció en $CaCl_2$ tan eficientemente como el WT. *ent3Δ* y *apm3Δ* fueron ligeramente sensibles a altas concentraciones de KCl y KNO_3 y fueron muy sensibles a $CaCl_2$. Todos los mutantes mostraron cierto grado de sensibilidad a HygB, que fue aliviado por KCl, un indicativo de hiperpolarización de la membrana.

Estos resultados demuestran que los mutantes del exómero comparten un defecto en la polarización de la membrana con otros mutantes deficientes en el tráfico desde el TGN, pero muestran una combinación única de fenotipos adicionales relacionados con alteraciones en la homeostasis del K^+ y el Ca^{2+} .

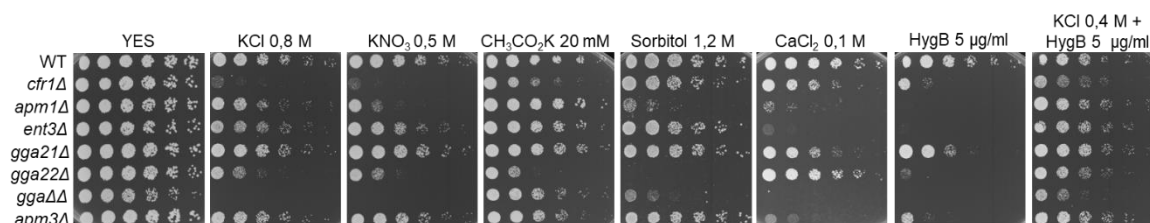


Figura 22. Sensibilidad a estrés de mutantes defectivos en adaptadores de clatrina. Células de las cepas indicadas se cultivaron en placas de YES y YES suplementado con los compuestos indicados a 28°C durante 4 días. WT, wild-type; *ggaΔΔ*, *gga21Δ gga22Δ*.

2. La distribución de lípidos en la MP está alterada en mutantes del exómero

2.1. Distribución de los esteroides

La distribución de los esteroides de membrana influye en la distribución de proteínas integrales de membrana, incluyendo la ATPasa Pma1, y se ha relacionado con el potencial de membrana y la tolerancia salina (Iwaki et al., 2008; Kodedová and Sychrová, 2015). Para obtener más información sobre el posible papel del exómero en la regulación de la distribución de esteroides, primero investigamos la relación entre el exómero, los esteroides y el estrés, comparando el crecimiento de los mutantes del exómero con el de *erg5Δ* y *erg28Δ* (mutantes deficientes en la síntesis de esteroides) y los correspondientes mutantes dobles. *erg5Δ* mostraba sensibilidad a sales de K^+ e HygB, que era más leve que en los mutantes del exómero. Era ligeramente más sensible que los mutantes del exómero a $CaCl_2$ y crecía bien en sorbitol (**Figura 23A**). *erg5Δ bch1Δ* era más sensible que el mutante simple a todos los compuestos excepto a sorbitol, al cual ninguno de ellos era sensible. Aunque *erg28Δ* mostraba un crecimiento lento en placas de YES, fue posible analizar su crecimiento bajo condiciones de estrés. Este mutante era sensible a sales de K^+ , HygB, $CaCl_2$ y sorbitol (**Figura 23A**). *erg28Δ bch1Δ* era incluso más sensible a todas las fuentes de estrés excepto

a sorbitol, una condición en la que crecía mejor que *erg28Δ*. Estos resultados sugieren que el exómero podría tener una función relacionada con los esteroides, pero no con la regulación de Erg5 y Erg28.

Para obtener más información sobre la relación del exómero con los esteroides, determinamos la distribución de estos lípidos en las cepas WT y *bch1Δ* utilizando la sonda de unión a esteroides mCherry-D4H. Esta sonda se une a los esteroides presentes en la parte interna de la MP. En YES, la distribución de esta sonda era similar en ambas cepas (**Figura 23B**, YES). Como está descrito (Marek et al., 2020), la señal estaba presente a lo largo de la MP, aunque no uniformemente. La fluorescencia era fuerte en las zonas de no crecimiento activo (los laterales de la célula) y débil en las zonas de crecimiento (los polos y el ecuador antes de la septación). Después de 1 h en KCl 0,6 M, observamos esta misma distribución de mCherry-D4H en el 98,8% de las células WT, mientras que en el 1,2% restante la sonda se distribuía uniformemente a lo largo de la MP con una intensidad de fluorescencia intermedia (**Figura 23B**, KCl 0,6 M y **Figura 23C**). En células *bch1Δ* tratadas con KCl, la intensidad de fluorescencia en las regiones de la membrana con una señal fuerte era muy variable, de forma que en algunas células era similar a la del WT pero en otras células estaba más cerca a los niveles de las células con distribución uniforme. Por esta razón las diferencias entre WT y *bch1Δ* no fueron significativas (**Figuras 23B y C**, panel superior). Aparte de esta variabilidad, la diferencia más llamativa entre células WT y mutantes era el porcentaje de células con fluorescencia uniforme, que aumentaba del 1,2 al 32,4% en el mutante (**Figura 23C**, panel inferior). Estos resultados demuestran que la distribución de la fracción de esteroides accesible a la sonda D4H era anómala en mutantes del exómero expuestos a KCl.

Como se ha descrito anteriormente, la distribución de Cta3 y Pkd2 en la superficie celular estaba alterada en mutantes del exómero tras un periodo corto después de su inducción (**Figura 17A,B**). Para entender si existía alguna correlación entre la distribución de Cta3 y los esteroides, observamos bajo el microscopio una cepa que portaba Cta3-GFP y mCherry-D4H 1 h después de añadir KCl 0,6 M. Cta3 se acumulaba en las zonas de crecimiento activo de la célula y estaba ausente en las zonas de no crecimiento (**Figuras 16E, 17A, 23B**).

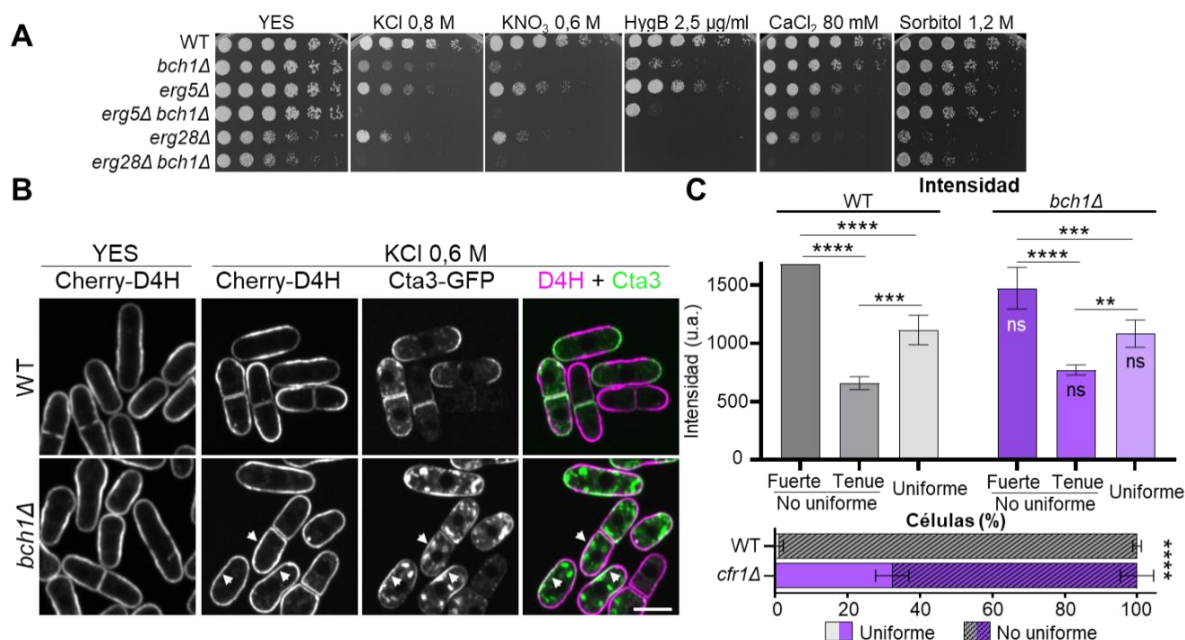


Figura 23. Relación entre el exómero y los esteroides de la membrana plasmática. (A) Células de las cepas indicadas se cultivaron en YES y YES suplementado con los compuestos indicados a 28°C durante 3 días. **(B)** Imágenes de células WT y *cfr1Δ* que expresan Cta3-GFP y la sonda de unión a esteroides mCherry-D4H, y que se incubaron en YES y YES con KCl 0,6 M durante 1 h. Las puntas de flecha indican regiones de la membrana con señales fuertes de GFP y mCherry. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Dragonfly. Barra de escala, 10 µm. **(C)** Panel superior; intensidad de fluorescencia de mCherry-D4H (u.a., unidades arbitrarias) en células WT y *cfr1Δ*. En las células con distribución no uniforme, se analizó por separado la intensidad en las regiones con fluorescencia intensa y fluorescencia débil. Los valores de cuatro experimentos independientes se relativizaron al valor del WT en regiones con fluorescencia fuerte. Panel inferior; porcentaje de células con una distribución de fluorescencia uniforme y no uniforme. Se representa la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias determinada utilizando los tests de comparaciones múltiples de Tukey (para la intensidad de fluorescencia) y Šidák (para el porcentaje de células). ns, no significativo; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por tanto, en el WT las regiones de la membrana con fluorescencia verde y roja no solapaban, lo cual indica que Cta3 se localiza en regiones de la membrana con baja abundancia de esteroides accesibles a D4H. En el mutante, Cta3-GFP mostraba una distribución asimétrica/subapical en los polos/ecuador de la célula (**Figuras 16E, 17A, 23B**). Esta distribución era diferente de la de los esteroides, que no era asimétrica. En consecuencia, una fracción de Cta3 se localizaba en regiones de la membrana con una fluorescencia de D4H mayor que las regiones en las que se localizaba Cta3 en el WT (algunos ejemplos se señalan con puntas de flecha en la **Figura 23B**).

2.2. Distribución del PI(4,5)P₂

La distribución de lípidos aniónicos a lo largo de las membranas de la célula, junto con su distribución asimétrica en ambas capas lipídicas, influye en la carga y la curvatura de las membranas, la distribución de las proteínas, el tráfico vesicular, los procesos de señalización y el posicionamiento del plano de división (Caillaud, 2019; Gurtovenko and Vattulainen, 2008; Platre and Jaillais, 2017; Yeung et al., 2008). Aunque los fosfoinosítidos (PI) no son muy abundantes, son muy aniónicos y, por tanto, su presencia y distribución tienen un impacto significativo en todos estos procesos. Además, se acumulan selectivamente en diferentes membranas, participando en procesos de regulación local y contribuyendo a la direccionalidad adecuada del tráfico vesicular (Behnia and Munro, 2005). En particular, el PI(4,5)P₂ está presente en la MP, participa en la secreción y la endocitosis, y modula la actividad de canales de K⁺ (Di Paolo and De Camilli, 2006; Suh and Hille, 2005). Por todo ello, analizamos si la ausencia del exómero repercutía en alteraciones en este lípido. Primero comparamos el crecimiento de *cfr1Δ* con el de *its3-1*, un mutante termosensible de la 1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinasa Its3 (Zhang et al., 2000). Observamos que el mutante *its3-1 cfr1Δ* era más termosensible que los mutantes simples *its3-1* y *cfr1Δ*, lo cual sugiere una interacción genética (**Figura 24A**). A continuación, determinamos la distribución de Its3-GFP y observamos que en las cepas WT y *cfr1Δ* la proteína aparecía como una línea de puntos fluorescentes distribuidos a lo largo de la membrana (**Figura 24B**). Quince minutos después de añadir KCl 0,6 M la mayoría de los puntos fluorescentes desaparecían de la MP, y se volvían a observar en ambas cepas nuevamente en la MP 30 minutos después del tratamiento.

Curiosamente, cuando analizamos el comportamiento de la sonda GFP-h\GAP1IP4BP(PH), que se une al PI(4,5)P₂ (Hammond et al., 2009), vimos que existían diferencias entre células WT y *cfr1Δ*. En el WT, la mayoría de la fluorescencia se observaba uniformemente a lo largo de la MP antes de añadir KCl (**Figura 24C**); además, había una fluorescencia débil en el citoplasma, que podría ser inespecífica o un exceso de sonda no unida a la membrana. Después de 15 minutos en KCl 0,6 M, la mayoría de la fluorescencia era citoplasmática, y se relocizaba a la membrana tras 30 minutos. La distribución de GFP-h\GAP1IP4BP(PH) en

cfr1Δ era similar a la del WT antes del estrés y tras 15 minutos en KCl. Sin embargo, la fluorescencia no se relocizaba en la membrana después de 30 minutos (**Figura 24C**).

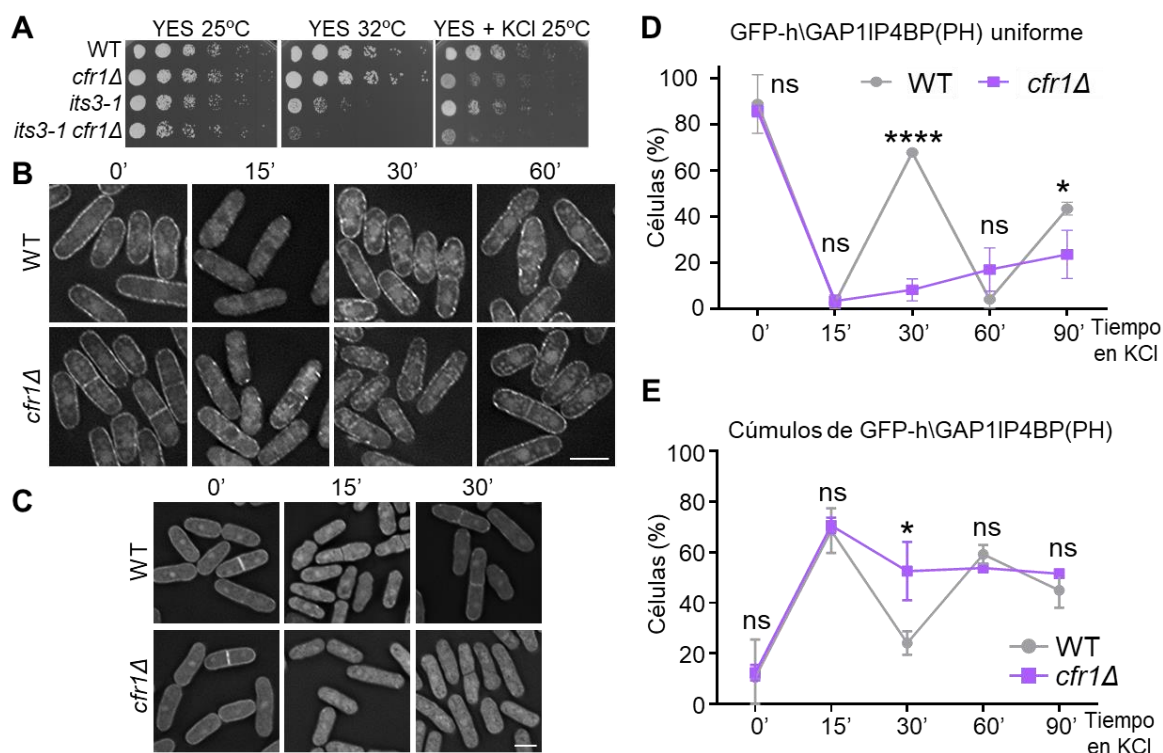


Figura 24. Relación entre el exómero y el PI(4,5)P2 de la membrana plasmática. (A) Células de las cepas indicadas se sembraron en palcas de YES y YES con KCl 0,6 M, y se incubaron a 25°C y 32°C durante 5 y 3 días, respectivamente. (B) Imágenes de células WT y *cfr1Δ* que expresan Its3-GFP incubadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). (C) Células WT y *cfr1Δ* que expresan la sonda de unión a PI(4,5)P2 GFP-hGAP1IP4BP(PH) y se incubaron con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). (D) Porcentaje de células WT y *cfr1Δ* con fluorescencia de GFP-hGAP1IP4BP(PH) en la periferia celular. Las células se incubaron con KCl 0,6 M y se capturaron en los tiempos indicados (minutos). (E) Porcentaje de células WT y *cfr1Δ* con fluorescencia de GFP-hGAP1IP4BP(PH) en cúmulos. Las células se incubaron con KCl 0,6 M y se capturaron en los tiempos indicados (minutos). En (B,C) las imágenes se capturaron con un sistema DeltaVision. En (D,E) para cada tiempo se muestran la media y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes, así como la significancia estadística de las diferencias determinada utilizando el test de comparaciones múltiples de Šidák. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; ****, $p < 0,0001$. En (B,C) barra de escala, 10 μm

Análisis cuantitativos del comportamiento de GFP-hGAP1IP4BP(PH) durante un tiempo más largo revelaron un comportamiento dinámico en la cepa WT, con ciclos de asociación y disociación con la MP (**Figura 24D**). En el mutante, la sonda se disociaba de la membrana después de 15 minutos en KCl y no se volvía a asociar con ella completamente incluso 90 minutos después del tratamiento. Cuando cuantificamos el porcentaje de células WT que presentan este PI en cúmulos al añadir KCl 0,6 M, encontramos que los valores siguen un

patrón de dientes de sierra a lo largo del experimento, mientras que las células *cfr1Δ* muestran menos variabilidad (**Figura 24E**). Como este comportamiento dinámico no se observaba en la enzima que sintetiza el PI(4,5)P₂, probablemente estuviera producido por cambios en la actividad de Its3 o en la accesibilidad de la sonda al PI(4,5)P₂.

En resumen, en ausencia del exómero y en presencia de KCl, la distribución de los esteroides y el PI(4,5)P₂ es diferente a la del WT, lo cual puede contribuir a una alteración en la polarización de membrana y la homeostasis iónica en el mutante.

3. Relación entre el exómero, los lípidos de la MP y la ruta de integridad celular

3.1. Los mutantes del exómero son defectuosos en la activación de la ruta CIP en respuesta a estrés osmótico

Los mutantes del exómero son sensibles a KCl y presentan defectos en septación en presencia de esta sal (Hoya et al., 2017). Para seguir estudiando el papel del exómero en la respuesta a KCl, decidimos analizar la relación de este complejo con las rutas de respuesta a estrés. Dado que la ausencia del exómero produce defectos en la localización del PI(4,5)P₂, que es importante para la regulación de las PKCs y la activación de la ruta CIP (Kabeche et al., 2015; Nelsestuen and Bazzi, 1991), y que esta ruta participa en un mecanismo de control que regula la formación del septo en respuesta a estrés (Edreira et al., 2020), nos centramos en analizar la respuesta CIP en el mutante del exómero. Como se ha indicado en la sección de antecedentes, resultados iniciales del laboratorio indicaban que esta ruta no se activaba eficientemente en ausencia del exómero en células tratadas con KCl y con acetato de potasio, pero sí lo hacía en respuesta a Caspofungina (Moro, 2018). En este trabajo hemos confirmado que el nivel de respuesta en células *cfr1Δ* tratadas con KCl 0,6 M era de aproximadamente un 50% del nivel del control WT (**Figura 25A**). Además, en esta tesis doctoral se ha extendido el análisis de la respuesta de la ruta CIP. Así, obtuvimos un resultado similar para el mutante *bch1Δ* (**Figura 25B**).

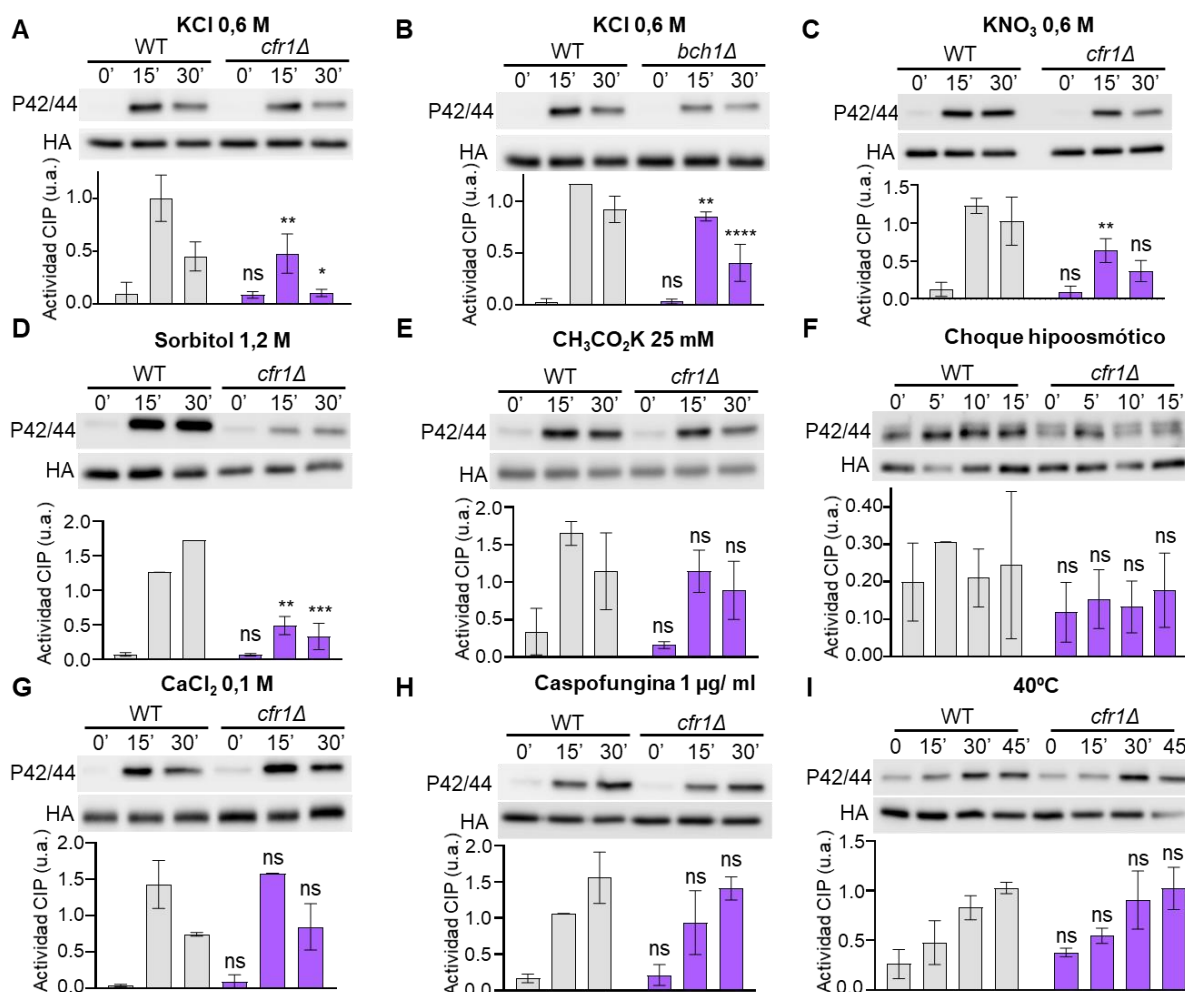


Figura 25. La activación de la ruta de integridad celular (CIP) en respuesta a estrés osmótico es defectuosa en mutantes del exómero. (A) Células del control silvestre (WT) y el mutante del exómero *cfr1Δ* fueron expuestas a KCl 0,6 M durante el tiempo indicado (minutos). Se analizó la activación de CIP por western blot en muestras con Pmk1-HA:6His purificada (Materiales y métodos), utilizando anticuerpos anti-p42/44 (Pmk1 fosforilada) y anti-HA (Pmk1 total). (B) Igual que en (A), pero el mutante del exómero fue *bch1Δ*. (C) Activación de CIP en células tratadas con KNO₃ 0,6 M. (D) Las cepas indicadas se recogieron por filtración, se transfirieron desde YES a YES con sorbitol 1,2 M, se incubaron durante los tiempos indicados y se analizaron para comprobar la activación de CIP. (E) Activación de CIP en células tratadas con CH₃CO₂K 25mM. (F) Células creciendo en YES con sorbitol 0,8 M se transfirieron a YES, se incubaron durante los tiempos indicados y se analizó su activación de CIP. (G) Activación de CIP en células tratadas con CaCl₂ 0,1 M. (H) Activación de CIP en células tratadas con Caspofungina 1 μg/ml. (I) Activación de CIP en células incubadas a 40°C durante el tiempo indicado. Todos los análisis se realizaron un mínimo de tres veces. Se muestra sólo uno de forma representativa. Las gráficas de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). u.a., unidades arbitrarias. Se muestran la media, la desviación estándar y la significancia estadística de las diferencias entre el WT y el mutante, tratados durante el mismo tiempo, determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Šidák. ns, no significativo; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ****, p < 0,0001.

Para determinar si la ausencia del exómero producía un defecto en la respuesta a cloruro, a potasio o al choque osmótico, analizamos en detalle la activación de CIP en células WT y *cfr1Δ* tratadas con diferentes compuestos. El mutante era defectuoso en la respuesta CIP a KNO_3 0,6 M (**Figura 25C**) y a sorbitol 1,2 M (**Figura 14D**), pero no a acetato de potasio 25 mM ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$, **Figura 25E**), una concentración suficientemente baja como para permitir el crecimiento del WT. Estos resultados sugieren que los mutantes del exómero son defectuosos en la respuesta a choque osmótico. A continuación, analizamos la respuesta CIP a choque hipoosmótico transfiriendo las células de YES suplementado con sorbitol 0,8 M a YES (**Figura 25F**). En estas condiciones, el rango de respuesta era menor que el observado con otros estímulos, lo cual incrementaba la variabilidad de los resultados; en consecuencia, las diferencias entre WT y mutante no eran significativas. Aun así, en cada experimento la señal para el mutante era menor que para el WT, sugiriendo que el exómero podría ser necesario para la activación efectiva en respuesta a choque hipoosmótico. Finalmente, analizamos la respuesta de algunas fuentes de estrés que no estaban relacionadas con cambios en la osmolaridad. Analizamos la respuesta a CaCl_2 0,1 M porque, como hemos visto anteriormente, los mutantes del exómero son defectuosos en la homeostasis del calcio. También analizamos en detalle la respuesta a Caspofungina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ porque los mutantes del exómero tienen un leve defecto en la composición de la pared celular, y el daño a la pared celular es un estrés que típicamente activa la ruta CIP (Barba et al., 2008; Cansado et al., 2022; Garcia et al., 2009; Hoya et al., 2017). Como fuente de estrés adicional, analizamos la respuesta de CIP a estrés térmico a 40°C. Los resultados mostraron que la activación de CIP era similar en células WT y *cfr1Δ* en respuesta a estas fuentes de estrés (**Figura 25G,H,I**).

A continuación, quisimos analizar si el defecto en la respuesta en CIP era específico o indirecto, ya que la ruta CIP presenta una regulación cruzada con otras rutas de señalización. Existe una relación funcional entre la ruta CIP, la calcineurina y la captación de calcio (Cansado et al., 2022; L. Deng et al., 2006; Sugiura et al., 1998), y los mutantes del exómero, como hemos visto anteriormente, tienen una actividad de la calcineurina alta y

presentan defectos en la homeostasis del calcio. De acuerdo con esto, investigamos si la activación de CIP reducida en *cfr1Δ* estaba relacionada con esos defectos.

Como se muestra en la **Figura 26A**, el nivel de activación de CIP en respuesta a KCl era significativamente mayor en las cepas que tenían la mutación *ppb1Δ* (carecían de la subunidad catalítica de la calcineurina) que en las correspondientes cepas control *ppb1+*. A pesar de esto, el nivel de fosforilación de Pmk1 seguía siendo menor en *cfr1Δ ppb1Δ* que en *ppb1Δ* (control *cfr1+*). Este resultado demuestra que la actividad calcineurina incrementada en los mutantes del exómero no es responsable de su defecto en la activación de CIP.

La expresión de fosfatasa que desfosforilan Pmk1 y, por tanto, inhiben la ruta CIP, depende de la proteína quinasa de la ruta SAPK, Sty1 (Madrid et al., 2007). En consonancia, investigamos la posibilidad de que la actividad reducida de CIP fuese una consecuencia de la hiperactivación de Sty1 y/o la acumulación de Pmp1, la fosfatasa más específica de Pmk1 (Cansado et al., 2022; Prieto-Ruiz et al., 2020; Sugiura et al., 1998, 2003). Como se muestra en la **Figura 26B**, los niveles de fosforilación de Sty1 en respuesta a KCl eran similares en las cepas WT y *cfr1Δ*. Además, los niveles de Pmp1 también eran similares en WT, *cfr1Δ* y *bch1Δ* (**Figura 26C**).

Existe una regulación cruzada entre CIP y TORC2, y los mutantes defectuosos en componentes y reguladores de TORC2 son sensibles a KCl (Ikeda et al., 2008; Madrid et al., 2016; Tatebe et al., 2010; Weisman and Choder, 2001). Por lo tanto, investigamos si la activación reducida de CIP dependía de TORC2 analizando la respuesta de CIP a KCl en ausencia de la quinasa de TORC2, Tor1. Observamos que la fosforilación de Pmk1 era menos eficiente en *tor1Δ cfr1Δ* que en *tor1Δ* (**Figura 26D**), un resultado que refutaba la hipótesis.

Resumiendo, todos estos resultados demuestran que los mutantes del exómero son defectivos en la respuesta CIP a estrés osmótico e indican que este defecto es específico, y no consecuencia de una desregulación de las rutas de la calcineurina, SAPK o TORC2.

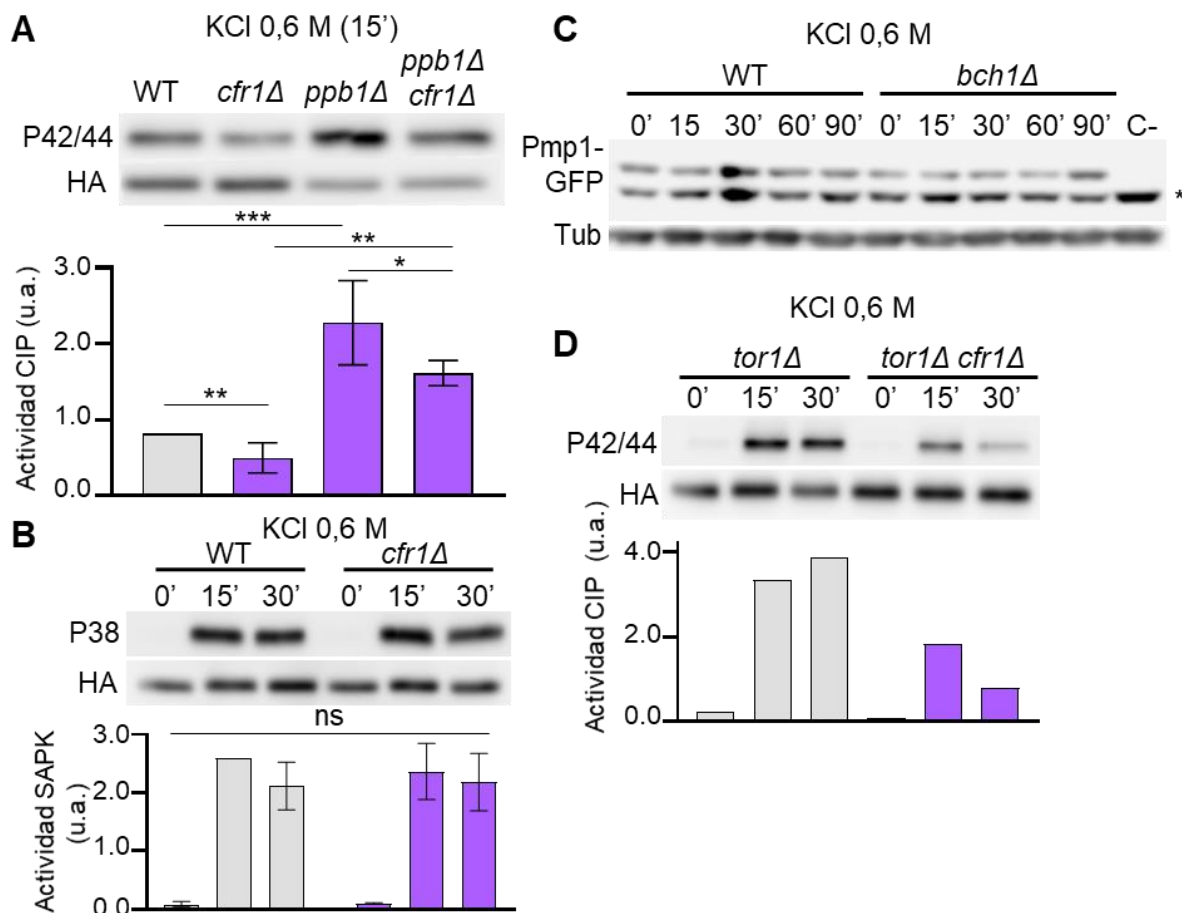


Figura 26. Relación entre la ruta de integridad celular (CIP) y otras rutas de señalización en mutantes del exómero. (A) Activación de CIP en las cepas indicadas tratadas con KCl 0,6 M durante 15 minutos. **(B)** Las cepas WT y *cfr1Δ* se incubaron con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados. Se analizó la ruta de respuesta a estrés por western blot en muestras con Sty1-HA:6His purificada (Materiales y métodos), utilizando anticuerpos anti-p38 (Sty1 fosforilada) y anti-HA (Sty1 total). **(C)** Cantidad de Pmp1-GFP en las cepas indicadas en presencia de KCl 0,6 M durante los tiempos indicados. C-, cepa sin Pmp1-GFP utilizada para detectar la banda inespecífica (asterisco). Tub (tubulina), control de carga. **(D)** La activación de CIP se determinó como en (A) en células *tor1Δ* y *tor1Δ cfr1Δ* tratadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados. En (A,B,D) los gráficos de barras representan la proporción entre la señal de la MAPK fosforilada (la banda de p42/44 en A,D y la banda de p38 en B) y la cantidad total de quinasa (banda de HA). u.a., unidades arbitrarias. En (A,B) se muestra la significancia estadística de las diferencias, determinada utilizando los tests de comparaciones múltiples de Tukey y Šidák respectivamente. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

3.2. El exómero no es un componente de la ruta CIP

El hecho de que el defecto en la activación de CIP en *cfr1Δ* y *bch1Δ* fuese parcial sugería que el exómero no es un componente esencial de esta ruta. Aun así, investigamos esta posibilidad en más detalle. Los mutantes de delección de los componentes esenciales de la ruta (representados en la **Figura 27A**) manifiestan un fenotipo característico denominado

fenotipo VIC (viable en placas con inmunosupresor y cloruro; Cansado et al., 2022; Ma et al., 2011; Sugiura et al., 1998). Por lo tanto, decidimos comparar el crecimiento de *cfr1Δ* y *bch1Δ* en placas de YES suplementadas con cloruro de magnesio (MgCl_2) y FK506, con el del WT y mutantes de CIP. Como se muestra en la **Figura 27B**, el WT y los mutantes del exómero fueron sensibles a estas condiciones, mientras que el resto de mutantes crecieron eficientemente.

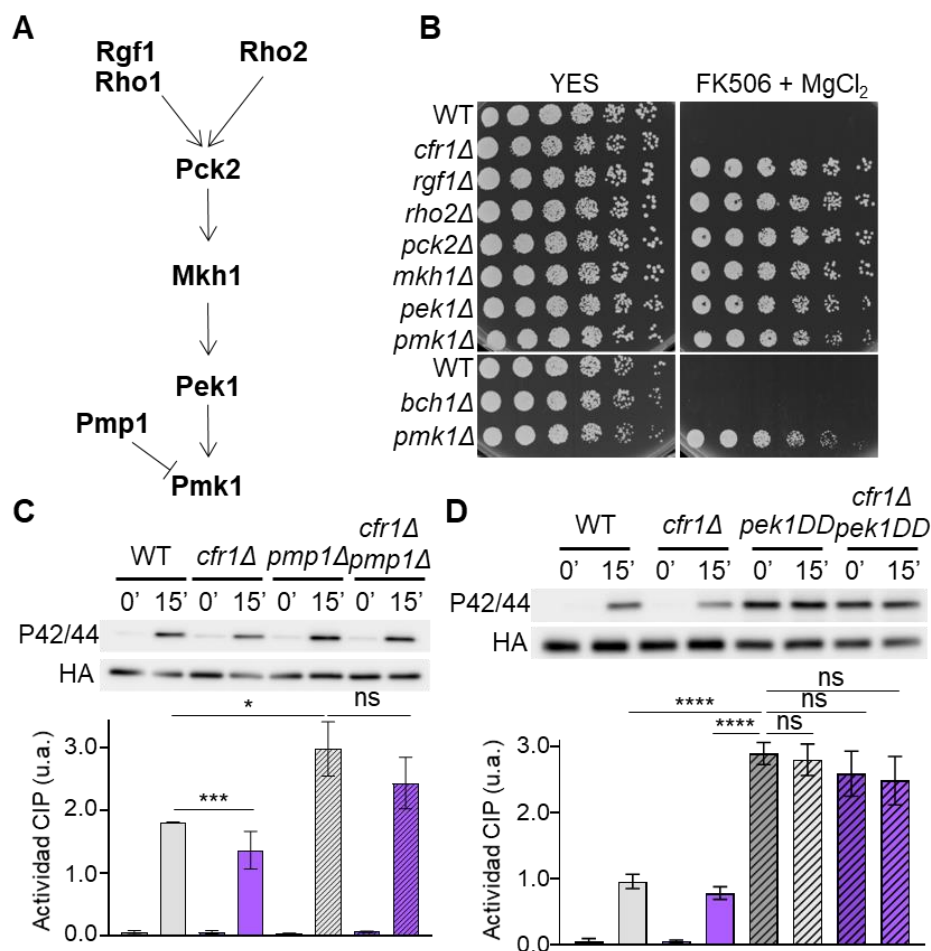


Figura 27. El exómero no es un componente de la ruta de integridad celular (CIP). (A) Representación esquemática del orden de acción de los componentes de CIP analizados en esta tesis doctoral. (B) Análisis del fenotipo *Viable en Inmunosupresor y Cloruro* (VIC) en las cepas indicadas. Se sembraron 3×10^4 células y varias diluciones seriadas 1:4 en placas de YES y YES con FK506 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y MgCl_2 0,2 M. Las placas se incubaron a 32°C durante dos días. (C) Actividad CIP en las cepas WT, *pmp1Δ*, *cfr1Δ* y *pmp1Δ cfr1Δ* tratadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados. (D) Lo mismo que en (C), pero utilizando las cepas WT, *cfr1Δ*, *pek1-5234D,238D* (*pek1DD*) y *cfr1Δ pek1DD*. En (C,D) los gráficos de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). u.a., unidades arbitrarias. Muestran la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

A continuación, nos preguntamos si el exómero es esencial para que la activación de CIP alcance su máximo nivel. Para responder a esta pregunta, incrementamos dicha actividad en el WT y el mutante del exómero mediante la utilización de dos mutaciones. En primer lugar, comparamos la actividad de CIP en cepas WT y *cfr1Δ* carentes de la fosfatasa Pmp1 (Sugiura et al., 1998). Como esperábamos, el grado de fosforilación de Pmk1 después de 15 minutos en KCl 0,6 M fue significativamente mayor en *pmp1Δ* que en el WT (**Figura 27C**). En estas condiciones, la fosforilación de Pmk1 era similar en las cepas *pmp1Δ* y *pmp1Δ cfr1Δ*, un resultado que muestra una supresión del fenotipo mutante del exómero. Por otro lado, utilizamos cepas con una versión mutante fosfomimética de Pek1, *pek1-S234D,T238D* (Sugiura et al., 1999; *pek1DD* a partir de ahora), bajo el control del promotor fuerte *act1+* integrado en su genoma (ver materiales y métodos). En este fondo genético los niveles de fosforilación de Pmk1 estaban aumentados respecto a las células control *pek1+* en ausencia de estrés (**Figura 27D**). El tratamiento con KCl 0,6 M durante 15 minutos no aumentaba más los niveles de fosforilación de Pmk1, lo cual estaba de acuerdo con una activación constitutiva. Finalmente, no había diferencias en los niveles de activación entre las cepas *pek1DD cfr1+* y *pek1DD cfr1Δ* que habían crecido en YES o en YES con KCl, lo que demostraba que la hiperactivación de Pmk1 suprime el defecto en la activación de CIP de los mutantes del exómero.

En conjunto, estos resultados confirman que el exómero no es un componente esencial de la ruta CIP y sugieren firmemente que el exómero regula la ruta de señalización por encima de Pmk1.

3.3. La distribución de los reguladores de CIP está alterada en los mutantes del exómero expuestos a KCl

Para obtener información sobre el papel del exómero en la regulación de CIP, analizamos la localización de los principales reguladores y componentes de la ruta. Los mecanosensores de la superficie celular Wsc1 y Mtl2 regulan a Rho1 en respuesta a estrés, pero no actúan en la señalización de la ruta (Cruz et al., 2013). Resultados iniciales de laboratorio sugerían que no había defecto en la localización de estas proteínas en las cepas mutantes del

exómero (Moro, 2018). Aun así, analizamos su distribución más detalladamente y confirmamos que era similar en las cepas WT y *cfr1Δ*, tanto en YES como en YES con KCl 0,6 M durante hasta 1 hora (**Anexo I-2**).

Rho2, la GTPasa que transmite la señal del estrés producido por cambios osmóticos a Pmk1 (Barba et al., 2008), está distribuida uniformemente por la MP en condiciones basales. Tras un choque osmótico se observa en una serie de cúmulos que colocalizan con PI(4,5)P₂, y esta asociación es importante para la activación de CIP (Kabeche et al., 2015). Ya hemos visto anteriormente que, en mutantes del exómero, el porcentaje de células que presentan una distribución uniforme de PI(4,5)P₂ en la superficie celular está alterado. Esta diferencia nos llevó a analizar la distribución de Rho2 en respuesta a KCl. No encontramos diferencias entre las cepas WT y mutante en lo relativo a los tiempos de agrupación de Rho2, el número de células con cúmulos de Rho2, o la intensidad de fluorescencia de GFP-Rho2 en la superficie celular (ni en cúmulos ni con su distribución uniforme; **Figura 28A,B**). Además, no existían diferencias en la cantidad de proteína (**Figura 28C**) y mCherry-Rho2 colocalizaba en ambas cepas con la sonda de unión a PI(4,5)P₂, GFP-hGAP1IP4BP(PH) (**Figura 28D**). Estos resultados indican que el defecto en la ruta CIP de los mutantes del exómero no es debido a alteraciones en Rho2.

Rgf1 es una GEF de Rho1 que activa CIP, y su presencia en la superficie celular de los polos desaparece tras añadir KCl 1 M (Garcia et al., 2009; Kabeche et al., 2015). Cuantificamos el porcentaje de células WT y *bch1Δ* que mostraban Rgf1-GFP en la superficie celular a diferentes tiempos de incubación con KCl 0,6 M siguiendo los criterios experimentales explicados en Materiales y métodos (**Figura 42**). En el WT este porcentaje se reducía tras 15 minutos y se incrementaba a los 60 y 90 minutos hasta llegar al mismo nivel que a tiempo 0 (**Figura 29A**). En el mutante, el porcentaje de células con Rgf1-GFP en la superficie era similar en los primeros tiempos de inducción, pero continuaba disminuyendo durante el experimento. Análisis por western blot demostraron que la cantidad de Rgf1-GFP no disminuía a lo largo del experimento en ninguna de las cepas (**Figura 29A**, panel inferior derecho), lo cual indicaba que la ausencia de Rgf1 en la superficie celular no era consecuencia de la degradación de la proteína. Este resultado indica que la asociación de

Rgf1 con la MP se reduce en respuesta a choque osmótico, y que esta reducción es más duradera en el tiempo en ausencia del exómero.

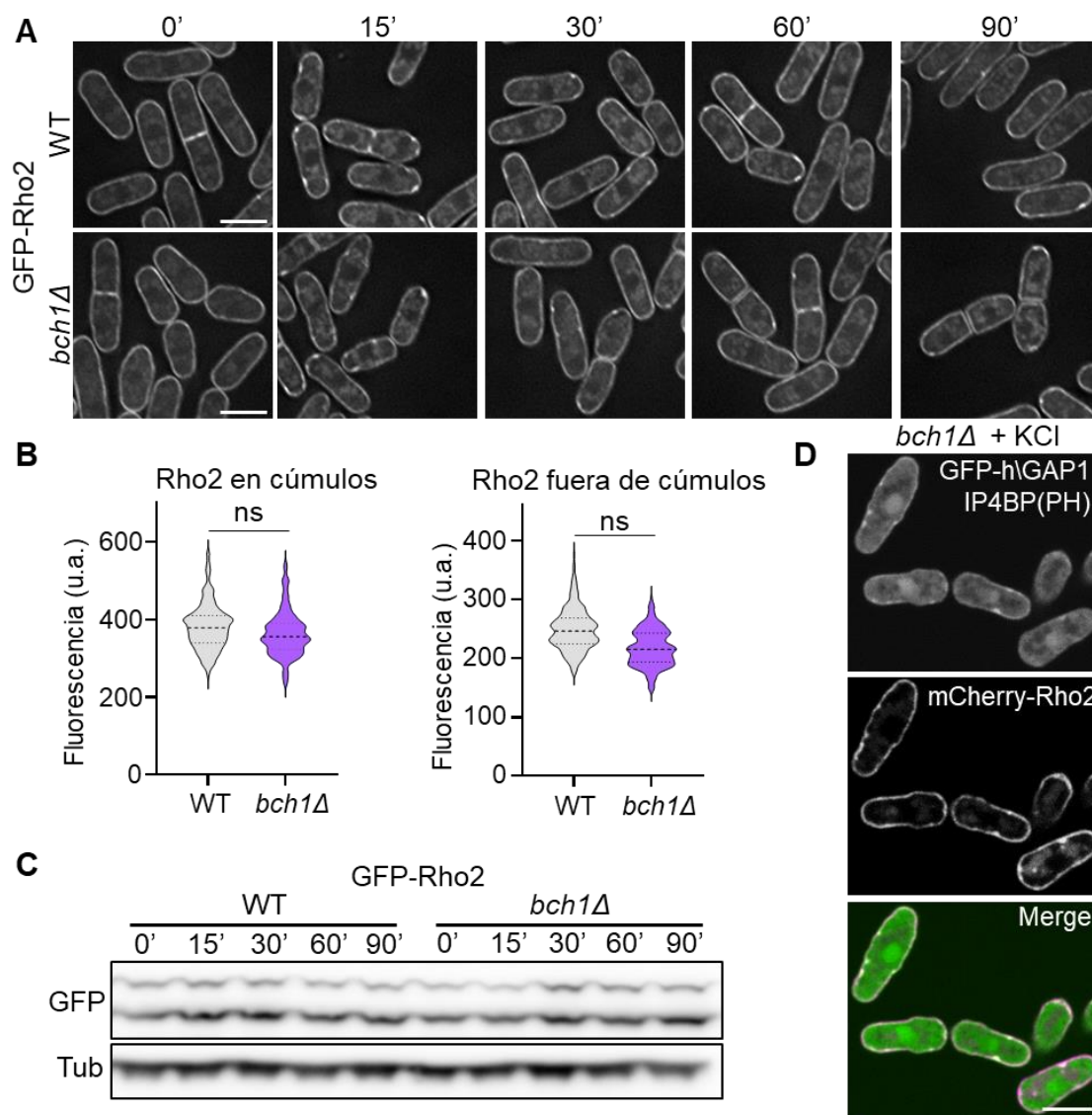


Figura 28. Análisis de la distribución de Rho2 en ausencia del exómero. (A) Imágenes de células WT y *bch1Δ* que expresaban GFP-Rho2 y que fueron incubadas en YES con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). (B) Intensidad de fluorescencia de la señal de GFP-Rho2 agrupada en cúmulos (panel izquierdo) o fuera de ellos (panel derecho). u.a., unidades arbitrarias. (C) Western blot de extractos celulares de las cepas WT y *bch1Δ* expresando GFP-Rho2 e incubadas en YES con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). Las membranas se inmunodetectaron con anticuerpos anti-GFP y anti-tubulina (Tub; control de carga). (D) Colocalización entre GFP-hGAP1IP4BP(PH) y mCherry-Rho2 en células *bch1Δ* expuestas a KCl 0,6 M durante 15 minutos. El color blanco en la superposición (merge) representa la coincidencia de las señales de ambas proteínas. En (A,D) las imágenes se capturaron con un sistema Deltavision. En (B) los experimentos fueron realizados por triplicado. Se muestra la media, desviación estándar y significancia estadística de la media entre los valores del WT y el mutante en los mismos puntos temporales. Se utilizó la prueba *t* (C). ns, no significativo. Barra de escala, 10 μ m.

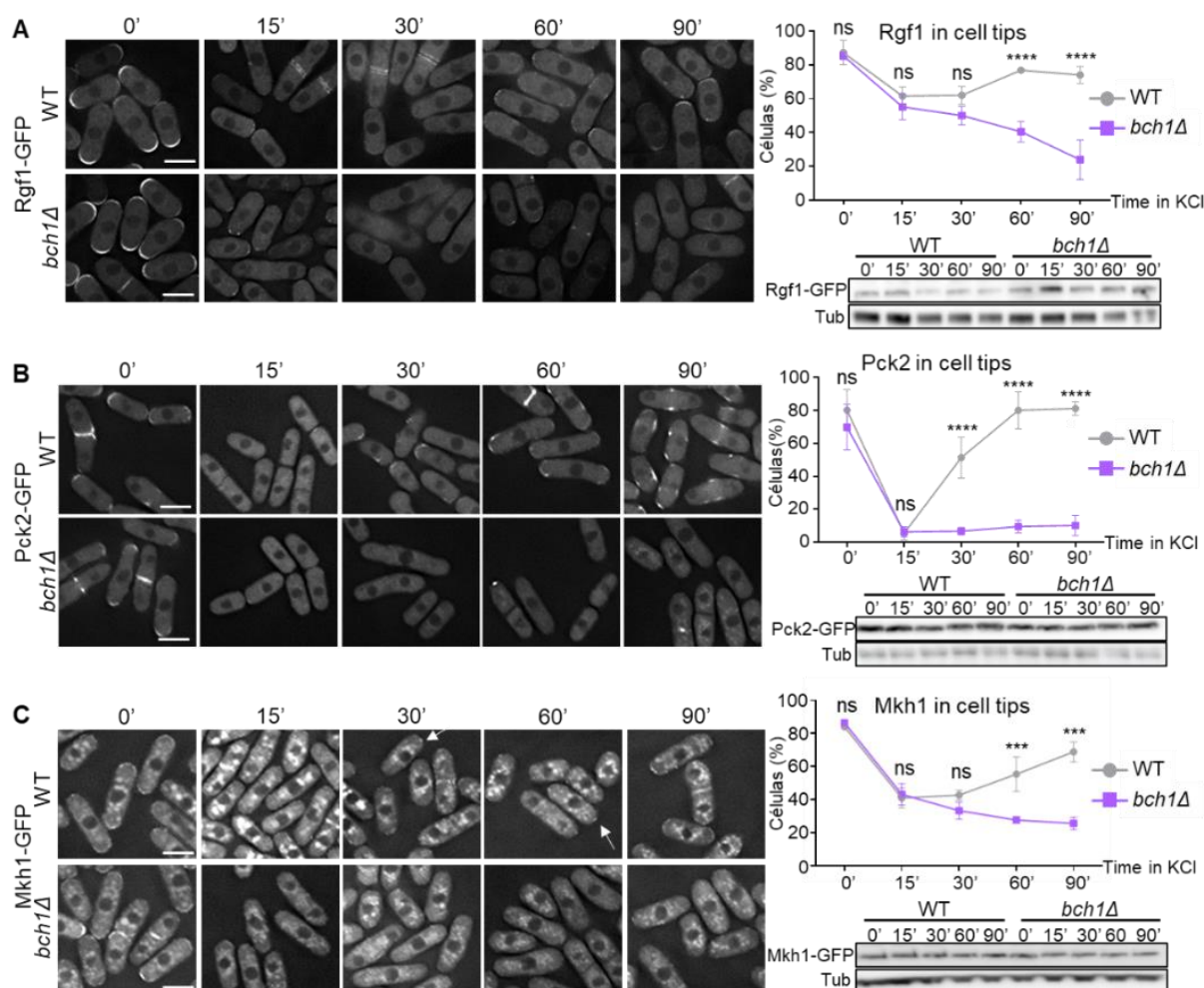


Figura 29. La distribución de los reguladores de la ruta de integridad celular (CIP) está alterada en mutantes del exómero expuestos a KCl. **(A)** Panel izquierdo, células WT y *bch1Δ* que expresan Rgf1-GFP tratadas con KCl 0,6 M fueron fotografiadas después del tiempo indicado (minutos). Panel superior derecho, porcentaje de células con Rgf1-GFP en la superficie en los puntos temporales indicados. Se contabilizaron las células con señal de fluorescencia en los polos y los laterales de la célula, pero no aquellas con señal en el ecuador y el septo (Materiales y métodos). Panel inferior derecho, extractos celulares de las mismas cepas tratadas con KCl 0,6 M se analizaron por western blot utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-tubulina (Tub; control de carga). **(B)** Lo mismo que en (A), pero las células expresan Pck2-GFP. **(C)** Lo mismo que en (A), pero las células expresan Mkh1-GFP. Las imágenes fueron capturadas en un sistema DeltaVision. Las flechas indican ejemplos de células con Mkh1-GFP en los polos. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Šidák para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los valores de las cepas WT y *bch1Δ* para un mismo punto temporal. ns, no significativo; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. Barra de escala, 10 μ m.

El ortólogo de PKC Pck2 es un regulador de CIP cuya presencia en los polos celulares se requiere para la activación de la ruta, y se localiza en el citoplasma después del choque osmótico (Arellano et al., 1999; Kanda et al., 2016). Cuando cuantificamos el porcentaje de

células con Pck2 en la superficie, los resultados indicaban que el choque osmótico tenía un mayor efecto en la distribución de esta proteína que en la de Rgf1, aun siguiendo un patrón similar de disminución a los 15 minutos y aumento posterior (**Figura 29B**). El porcentaje de células *bch1Δ* con Pck2 en la superficie disminuía a los 15 minutos y se mantenía bajo durante el resto del experimento. Un análisis por western blot mostró que la cantidad de Pck2-GFP era similar en las dos cepas y no variaba después de añadir KCl (**Figura 29B**, panel inferior derecho).

Mkh1, la proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno (MAPKKK), se localiza en los polos celulares de forma dependiente de Pck2, y esta localización es necesaria para la adecuada señalización de CIP (Kanda et al., 2016; Sengar et al., 1997). Por ello, cuantificamos la presencia de esta quinasa en la superficie celular después de un choque osmótico. Observamos que las células WT presentaban fluorescencia de Mkh1-GFP en los polos. Su presencia en esa zona disminuía tras 15 minutos de tratamiento con KCl 0,6 M y posteriormente aumentaba hasta los 90 minutos (**Figura 29C**). En el caso de *bch1Δ*, la cantidad de Mkh1-GFP en los polos disminuía a lo largo del experimento, llegando a un mínimo después de 90 minutos de tratamiento con KCl 0,6 M. La cantidad de Mkh1-GFP era similar en ambas cepas en todos los puntos temporales (**Figura 29C**, panel inferior derecho).

No analizamos la distribución de Pek1-GFP en presencia de KCl porque la intensidad de su fluorescencia era demasiado baja para realizar los experimentos. Respecto a Pmk1-GFP, esta quinasa se localiza en el citoplasma, núcleo, septo y huso mitótico tanto en condiciones basales como en condiciones de estrés (Madrid et al., 2006; Sánchez-Mir et al., 2012). En general, la localización de Pmk1 en el WT y el mutante del exómero era similar en YES y YES con KCl 0,6 M (**Anexo I-3**). Sólo encontramos una diferencia significativa en el porcentaje de células que presentaban Pmk1-GFP en la zona del septo, que era mayor en el mutante después de 60 minutos en KCl. Esta diferencia, que no detectamos a tiempos más cortos o más largos, podría estar relacionada con el hecho de que Pmk1 participa en la vigilancia del mecanismo de constricción del anillo de acto-miosina bajo condiciones de estrés, y a que los mutantes del exómero producen septos anormales cuando crecen en presencia de KCl

(Edreira et al., 2020; Hoya et al., 2017). La cantidad de Pmk1, analizada mediante western blot, era similar en ambas cepas a lo largo del experimento (**Anexo I-3**).

En resumen, la localización de los reguladores de CIP Rgf1 y Pck2, y de la MAPKKK Mkh1 en la superficie celular es menor en mutantes del exómero que en células WT en presencia de KCl. Además, esta reducción no es debida a una cantidad reducida de proteína.

3.4. En mutantes del exómero el defecto en la activación de CIP correlaciona con defectos en la localización de Pck2

Resultaba especialmente interesante el hecho de que, aunque en ausencia del exómero había un defecto en la activación de CIP a los 15 minutos tras un choque osmótico (**Figuras 25, 26 y 27**), a este tiempo el porcentaje de células WT y mutantes con componentes de CIP en su superficie era similar (**Figura 29**). Para obtener más información sobre la relación entre ambos procesos, analizamos la activación de CIP y la distribución de los activadores de la ruta a intervalos cortos de tiempo. Encontramos que en el WT la activación de CIP era detectable a los 2,5 minutos tras añadir KCl, y después continuaba con un patrón de activación bifásico, consistente de un pequeño pico de activación de Pmk1 a los 5 minutos y un pico mayor a los 12,5 minutos (**Figura 30A**). A partir de ese punto, el nivel de fosforilación de Pmk1 disminuía, alcanzando su valor mínimo a los 30 minutos. En una cepa *cfr1Δ*, el nivel de fosforilación de Pmk1 no seguía ese patrón bifásico. En su lugar, aumentaba lenta y progresivamente desde los 2,5 minutos, alcanzando un máximo a los 7,5 minutos, con un valor similar al del WT en este punto temporal. Después, el nivel de fosforilación de Pmk1 disminuía lentamente hasta su valor mínimo a los 30 minutos. La diferencia entre los valores para ambas cepas era significativa a los 12,5 y 15 minutos.

A continuación, determinamos el porcentaje de células que presentaban un regulador de CIP en la superficie celular en los mismos puntos temporales. Elegimos Pck2 porque la fluorescencia de Pck2-GFP era mayor que la de Rgf1-GFP y Mkh1-GFP, lo cual hacía más fácil identificar las células que presentaban proteína en su superficie (**Figura 29**). Además, Pck2-GFP sufría los cambios más evidentes en su distribución en ambas cepas (**Figura 29**) y, por tanto, nos permitía observar diferencias más sutiles entre cepas.

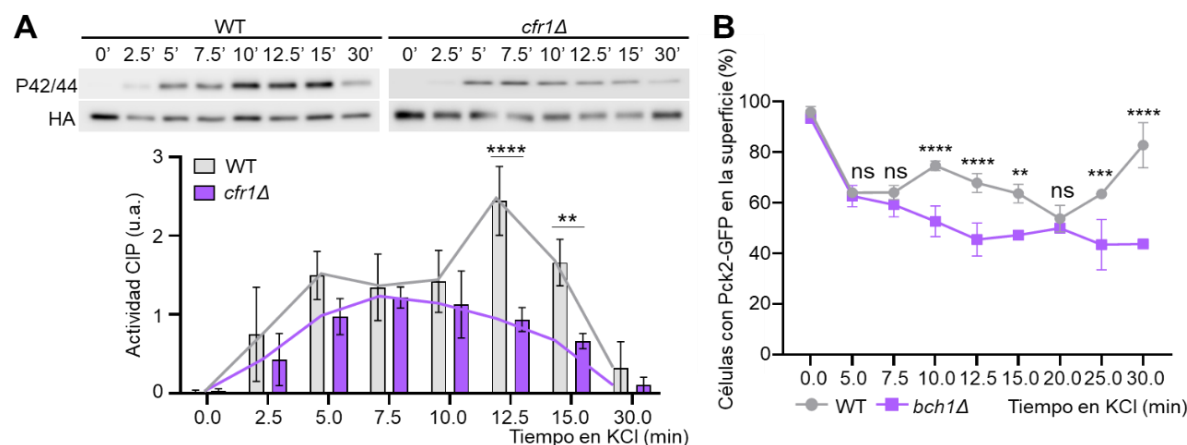


Figura 30. Una activación ineficiente de la ruta de integridad celular (CIP) correlaciona con defectos en la localización de Pck2. (A) Células WT y *cfr1Δ* se trataron con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). Se analizó la activación de CIP por western blot en muestras con Pmk1-HA:6His purificada, utilizando anticuerpos anti-p42/44 (Pmk1 fosforilada) y anti-HA (Pmk1 total). Las gráficas de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). u.a., unidades arbitrarias. Se han dibujado gráficos de líneas para los mismos valores para facilitar la comparación en la dinámica de activación de CIP en ambas cepas. **(B)** Porcentaje de células incubadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados que mostraron Pck2-GFP en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador y el septo (Materiales y métodos). En (A, B) se muestran la media y la desviación estándar. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Šidák para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los valores de las cepas WT y *bch1Δ* para un mismo punto temporal. ns, no significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Por otra parte, Pck2 canaliza la señalización de Rgf1 hacia Mkh1, y es necesaria para la correcta localización y activación de Mkh1 (Garcia et al., 2009; Kanda et al., 2016). Por todo esto, razonamos que el análisis del comportamiento de Pck2 nos aportaría información sobre el comportamiento de los demás reguladores. Además, para el experimento mostrado en la **Figura 30B** utilizamos un microscopio confocal Dragonfly, en vez de un microscopio DeltaVision, debido a su mayor sensibilidad. En consecuencia, los valores de las **Figuras 29B y 30B** no se pueden comparar directamente. En el WT, el porcentaje de células con Pck2 en la superficie celular disminuía 5 minutos después de añadir KCl al cultivo, y se mantenía bajo hasta los 10 minutos. En ese punto, se incrementaba levemente y descendía hasta alcanzar su valor mínimo a los 20 minutos. A partir de los 25 minutos el porcentaje seguía aumentando hasta los 30 minutos (**Figura 30B**). En el mutante *bch1Δ*, el porcentaje de células con Pck2 en la superficie celular disminuía 15 minutos después del choque osmótico y permanecía bajo hasta el final del experimento. Por tanto, las cepas WT y *bch1Δ* presentan dinámicas diferentes de asociación de Pck2 con la superficie celular: en

una cepa WT sigue un patrón bifásico que recuerda al patrón de activación de CIP, mientras que en el mutante no.

Los resultados demuestran que tanto la activación de la ruta CIP como la localización de Pck2 son defectuosas en la ausencia del exómero desde momentos tempranos de tratamiento con KCl. Finalmente, analizamos la presencia de Pck2 en la superficie de células WT y mutantes tratadas con otras fuentes de estrés. Encontramos que, después de la exposición a KNO_3 0,6 M y sorbitol 1,2 M, había menos células *bch1Δ* que tuvieran presencia de Pck2 en la superficie comparado con las células WT (paneles izquierdo y central en la **Figura 31**). Por el contrario, no encontramos una diferencia significativa entre ambas cepas cuando añadimos $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 25 mM a los cultivos (panel derecho en **Figura 31**). En conclusión, estos resultados revelan una correlación entre los defectos en la dinámica de la asociación de Pck2 con la superficie celular y los defectos en la activación de CIP en los mutantes del exómero. Esto concuerda con el hecho de que Pck2 es la encargada de transducir la respuesta a cambios en la osmolaridad (Barba et al., 2008; Cansado et al., 2022).

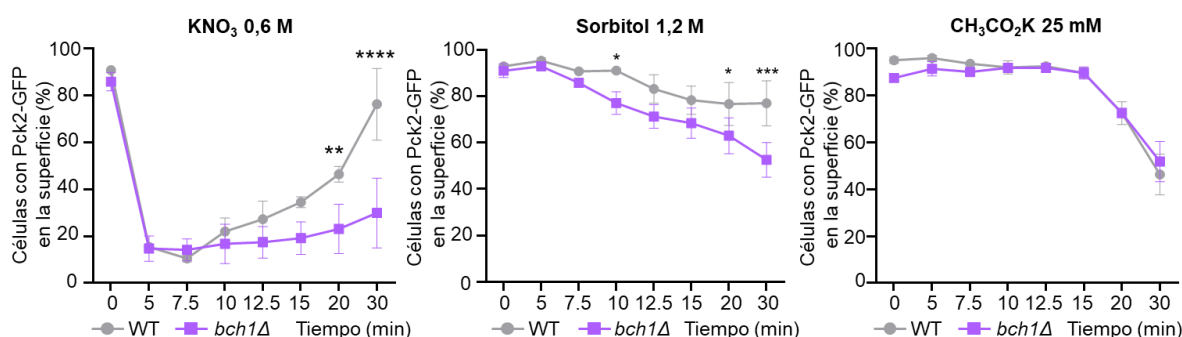


Figura 31. Localización de Pck2 en presencia de distintas fuentes de estrés. Porcentaje de células incubadas con KNO_3 0,6 M (panel izquierdo), sorbitol 1,2 M (panel central) o $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ 25 mM (panel derecho) durante los tiempos indicados que mostraron Pck2-GFP en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador y el septo (Materiales y métodos). Se muestran la media y la desviación estándar. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Šidák para determinar la significancia estadística de las diferencias entre los valores de las cepas WT y *bch1Δ* para un mismo punto temporal. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

3.5. Un aumento en la disponibilidad de PI4P y otros PLs en la MP suprime el defecto en la distribución de Pck2 en ausencia del exómero

La regulación de PKC y la activación de CIP requieren PI(4,5)P2 (Kabeche et al., 2015; Nelsestuen and Bazzi, 1991). Como hemos visto anteriormente, los mutantes del exómero presentan una alteración en la distribución de este lípido en respuesta a KCl (**Figuras 24C-E**). Además, al analizar la intensidad de la fluorescencia de la sonda GFP-h\GAP1IP4BP(PH), se vio que su cantidad está reducida en estos mutantes (**Figura 32A**, panel izquierdo). Por ello, investigamos si un incremento en la síntesis de PI(4,5)P2 suprimiría los defectos en la distribución de Pck2 y en la activación de CIP de los mutantes. Para responder a esta pregunta generamos una cepa que expresaba la 1-fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa *its3+* bajo el control del promotor *act1+*, que nos permitiría una expresión constitutiva fuerte (Pombase [<https://www.pombase.org/>]; (Wood et al., 2012). Esta construcción producía todos los fenotipos esperados al aumentar la expresión de *its3+* (Kabeche et al., 2015; Li et al., 2014): aumentaba los niveles de fluorescencia de GFP-h\GAP1IP4BP(PH) (**Figura 32A**), ocasionaba la aparición de células hinchadas (**Figura 32A**, panel derecho, y **Anexo I-4**), inducía la formación de burbujas e invaginaciones en la MP (**Figura 32B**) y aumentaba la activación de CIP (**Figura 32C**). Además, esta construcción suprimía el defecto en la distribución de PI(4,5)P2 de *cfr1Δ* (**Figura 32D**).

Todos estos resultados estaban de acuerdo con que *its3+* se estaba sobreexpresando. Sin embargo, esta sobreexpresión no suprimía el defecto en la asociación de Pck2 con la MP ni la activación de CIP (**Figura 33A,B**). Hipotetizamos que la supresión de estos defectos podría requerir una cantidad de PI(4,5)P2 que podría no estar alcanzándose en estas cepas debido a una escasez de PI4P, el sustrato de Its3. Por tanto, construimos cepas que expresaban tanto *its3+* como la 1-fosfatidilinositol 4-quinasa asociada a membrana *stt4+* a partir del promotor *act1+*. Como control, generamos cepas que sólo expresaran *stt4+* a partir de este promotor fuerte.

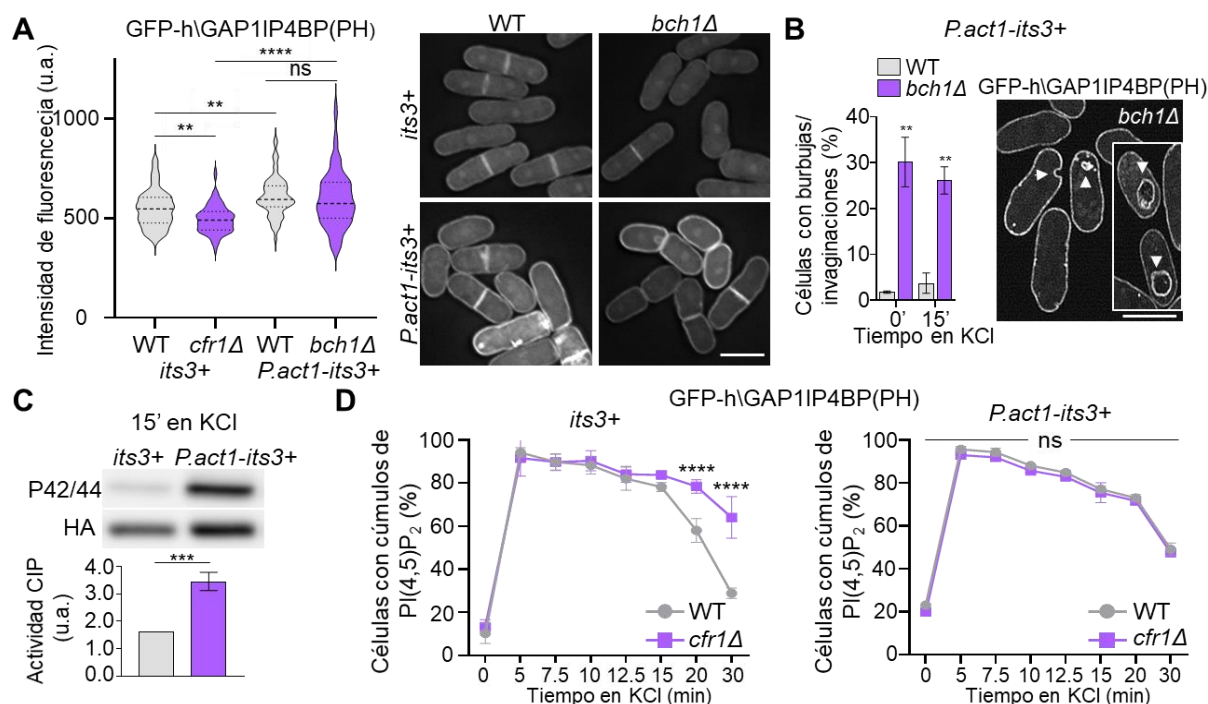


Figura 32. Análisis de la sobreexpresión de *its3+* a partir del promotor de *act1+*. (A) Panel izquierdo, intensidad de fluorescencia de GFP-hGAP1IP4BP(PH) en la membrana, indicativo de la cantidad de PI(4,5)P₂, en las cepas WT y *cfr1Δ* que expresan Its3 a partir de su promotor nativo (*its3+*) o el promotor de *act1+* (*P.act1-its3+*) incubadas en medio YES. Panel derecho, imágenes capturadas al microscopio de los mismos cultivos. (B) Panel izquierdo, cuantificación del porcentaje de células WT y *bch1Δ*, que expresan el alelo *P.act1-its3+* y la sonda GFP-hGAP1IP4BP(PH), que presentan burbujas e invaginaciones en la MP al ser tratadas con KCl durante el tiempo indicado (minutos). Panel derecho, ejemplos de burbujas e invaginaciones en células *bch1Δ*. La flecha indica una invaginación, y las puntas de flecha indican burbujas. (C) Activación de CIP en células control (*its3+*) y células que sobreexpresan *its3+* (*P.act1-its3+*) incubadas en presencia de KCl 0,6 M durante 15 minutos. (D) Porcentaje de células WT y *cfr1Δ* con fluorescencia de GFP-hGAP1IP4BP(PH) distribuida en cúmulos cuando expresan Its3 a partir de su promotor nativo o del promotor *act1+*. Los experimentos se realizaron por triplicado. Las imágenes se capturaron con un microscopio confocal Dragonfly. u.a., unidades arbitrarias. Los gráficos representan la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias, de acuerdo a los tests de comparaciones múltiples de Tukey (A) y Šidák (B,D), y a la prueba *t* (C). ns, no significativo; **, *p* < 0,01; ***, *p* < 0,001; ****, *p* < 0,0001. Barra de escala, 10 μm.

Analizamos el comportamiento de la relocalización de Pck2 en estas cepas cuantificando el porcentaje de células con Pck2 en la superficie celular 40 minutos después de añadir KCl 0,6 M (Figura 33C). A los 40 minutos, este porcentaje era mayor en la cepa *bch1Δ* que sobreexpresaba *its3+* y *stt4+* que en la cepa que sólo sobreexpresaba *its3+*, resultado que apoyaba la hipótesis de la escasez de PI4P. Sorprendentemente, en la cepa que sólo sobreexpresaba *stt4+*, observamos una supresión total del defecto de *bch1Δ* (Figura 33C). Este resultado sugiere con rotundidad que los mutantes del exómero tienen un defecto en

la cantidad de PI4P en la membrana. También sugiere que, aunque el PI(4,5)P2 parece participar en la asociación de Pck2 a la membrana, el PI4P es fundamental para dicha asociación.

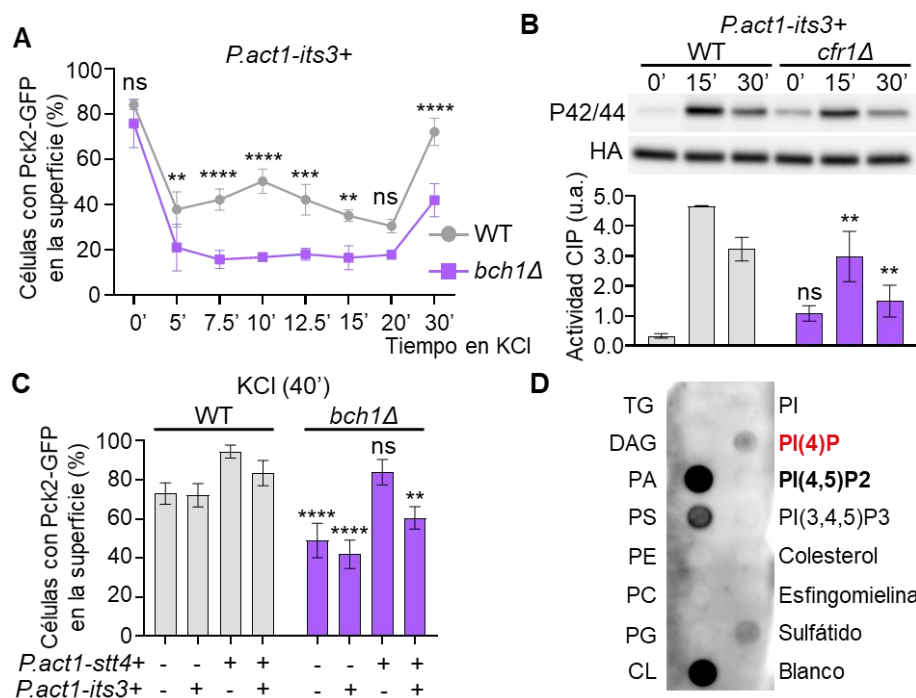


Figura 33. Relación entre los fosfoinosítidos de membrana plasmática, la localización de Pck2 y la activación de la ruta CIP. (A) Células WT y *bch1Δ* que expresan Pck2-GFP y sobreexpresan *its3+* se trataron con KCl 0,6 M durante los minutos indicados, y se fotografiaron. Se analizó el porcentaje de células con fluorescencia en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador o el septo (materiales y métodos). **(B)** Activación de CIP en células WT y *cfr1Δ* que sobreexpresan *its3+* tratadas con KCl 0,6 M durante los minutos indicados. **(C)** Porcentaje de células WT y *cfr1Δ* que expresan Pck2-GFP con fluorescencia de la GFP en la superficie de la célula, estimado como en (A), después de 40 minutos de tratamiento con KCl 0,6 M. Las células expresan los genes indicados bajo el promotor de *act1+*. **(D)** Ensayo de interacción lípido-proteína que evalúa la unión de Pck2 a lípidos de membrana. TG, triglicéridos; DAG, diacilglicerol; PA, ácido fosfatídico; PS, fosfatidilserina; PE, fosfatidiletanolamina; PC, fosfatidilcolina; PG, fosfatidilglicerol; PI, fosfatidilinositol; PI4P, fosfatidilinositol 4-fosfato; PI(4,5)P2, fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato; PI(3,4,5)P3, fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato; Sulfátido, 3-sulfogalactosilceramida. En (B) la gráfica de barras representa la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). Se muestra la media, la desviación estándar y la significancia estadística de las diferencias entre las cepas WT y mutante en los mismos puntos temporales de tratamiento. Se utilizó el test de comparaciones múltiples de Šidák (A,B,C.). ns, no significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Cuando analizamos los niveles de PI4P y PI(4,5)P2 en células que expresaban *stt4+* a partir del promotor *act1+*, descubrimos que no había un incremento en la fluorescencia de la sonda de unión a PI4P GFP-2xPH(Osh2), que se une a este lípido en la MP (Stefan et al.,

2011, **Figura 34A**), pero sí existía un fuerte incremento en la fluorescencia de la sonda de unión a PI(4,5)P₂, GFP-h\GAP1IP4BP(PH) (**Figura 34B**). Razonamos que la construcción *P.act1-stt4+* podría estar produciendo un incremento limitado de la cantidad de PI4P en la MP debido a su rápida conversión en PI(4,5)P₂ (Dickson et al., 2014) y a que no se están sobreexpresando los adaptadores de Stt4, Efr3 e Ypp1. Probablemente debido a esto, no había un incremento neto significativo de la fluorescencia de la sonda GFP-2xPH(Osh2). Aun así, esta construcción producía células hinchadas (**Anexo I-4**), lo que indicaba sobreexpresión. Además, complementaba el defecto de los mutantes del exómero (**Figura 33C**), probablemente porque hace que haya una síntesis continua de PI4P que estabiliza a Pck2 en la MP a través de asociación directa y/o por abastecimiento de sustrato para Its3. En conjunto, estos resultados sugieren fuertemente que la asociación de Pck2 con la MP requiere la presencia de PI4P y PI(4,5)P₂, y que los mutantes de exómero tienen un déficit de PI4P en la MP.

Para investigar si Pck2 interacciona con PI4P, expresamos esta proteína en *Escherichia coli* y realizamos un ensayo de interacción utilizando tiras de lípidos de membrana (ver Materiales y métodos). De acuerdo con los resultados (**Figura 33D**), Pck2 tiene una alta afinidad por cardiolipina (CL) y por ácido fosfatídico (PA), y una menor afinidad por fosfatidilserina (PS), sulfátidos y PI4P. Dado que la CL y los sulfátidos están presentes, respectivamente, en la membrana interna mitocondrial y el sistema nervioso, su unión a Pck2 de *S. pombe* probablemente carece de significado biológico. Para abordar la posibilidad de que una deficiencia en PS pueda contribuir a defecto en la asociación de Pck2 a la MP de los mutantes del exómero, analizamos su distribución utilizando una sonda LactC2-GFP (Curto et al., 2014). La intensidad de fluorescencia en células *cfr1Δ* a todos los tiempos de tratamiento era mayor que en el silvestre (**Figura 35A,B**). Este resultado refuta la hipótesis de que un defecto en la PS en la cara interna de la membrana sea responsable de la asociación ineficiente de Pck2 con la MP.

Si la débil interacción de Pck2 con el PI4P detectada en la tira de lípidos refleja una unión *in vivo*, el PI4P podría estar contribuyendo a la estabilización de Pck2 en la MP, lo cual explicaría la supresión del fenotipo de *bch1Δ* por la sobreexpresión de *stt4+* (**Figura 33C**).

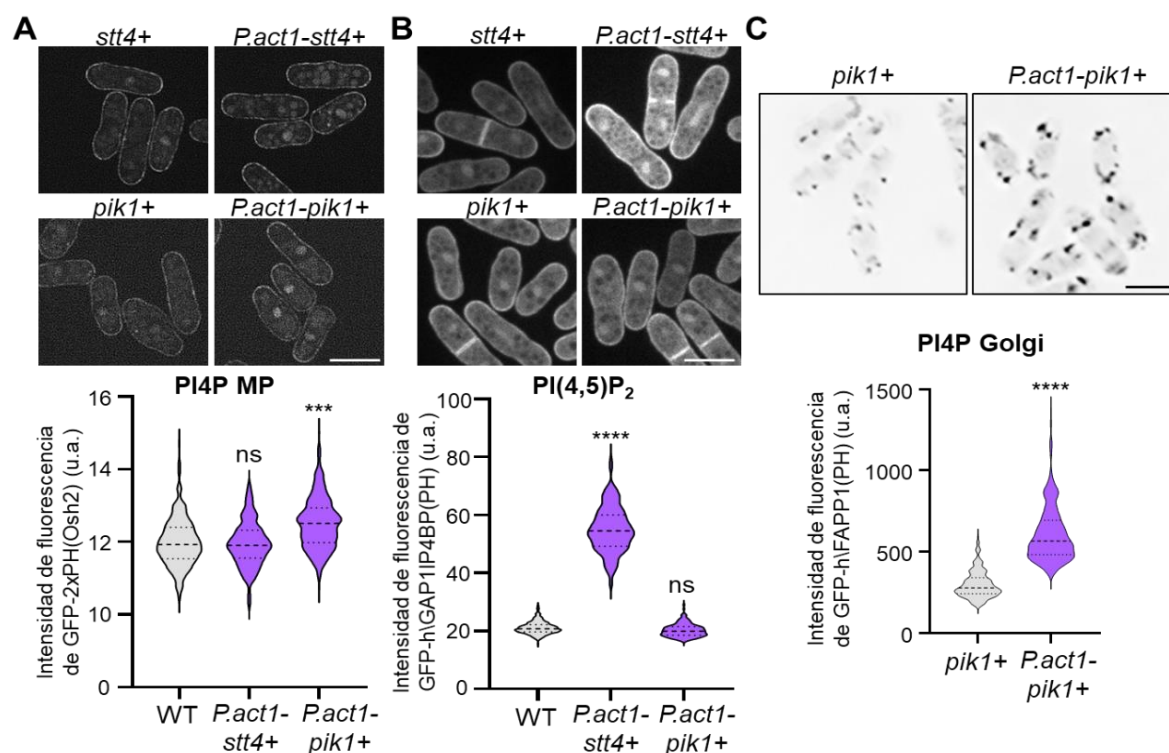


Figura 34. Intensidad de fluorescencia de diferentes sondas de unión a lípidos. (A) Intensidad de fluorescencia de la sonda de unión a PI4P en la MP, GFP-2xPH(Osh2), en células que expresan los genes indicados bajo el control de su promotor nativo (*stt4+*, *pik1+*) y el promotor de *act1* (*P.act1-stt4+*, *P.act1-pik1+*). Las células se incubaron en YES y se fotografiaron. (B) Lo mismo que en (A), pero las células expresaban la sonda de unión a PI(4,5)P₂, GFP-h\GAP1IP4BP(PH). (C) Células que expresan *pik1+* a partir de su promotor nativo (*pik1+*) y a partir del promotor de *act1* (*P.act1-pik1+*) y que expresan la sonda de unión a PI4P en el Golgi, GFP-h\FAPP1(PH), se incubaron en YES y se fotografiaron. Los paneles superiores muestran las imágenes capturadas en un microscopio confocal Dragonfly (A), confocal spinning disk (B) y un sistema Deltavision (C). Barra de escala, 10 μ m. Los paneles inferiores muestran gráficos de violín que representan la distribución de los datos obtenidos para la intensidad de fluorescencia. u.a., unidades arbitrarias. Se muestra la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias, determinada mediante los tests de comparaciones múltiples de Dunnett (A,B) y Tukey (C). ns, no significativo; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

Como ya habíamos observado que el defecto en la asociación de Pck2 con la membrana correlacionaba con un defecto en la activación de CIP (**Figuras 30 y 31**), investigamos si *P.act1-stt4+* suprimía el defecto en la activación de CIP en *cfr1Δ*. Los resultados demostraron que este no era el caso (**Figura 36A**). Nos preguntamos si esto se debía a que otros componentes de CIP no se estaban localizando correctamente al sobreexpresar *stt4+*. El análisis de la localización de Rgf1 y de Mkh1 en estas condiciones demostró que, en efecto, estos componentes de CIP no se relocalizaban a la MP en el mutante después del choque osmótico (**Figura 36B**). Estos resultados demuestran que la presencia de Pck2 en la

MP es necesaria pero no suficiente para la activación eficiente de CIP, y que el PI4P estabiliza a Pck2 en la membrana, pero no a Rgf1 ni a Mkh1.

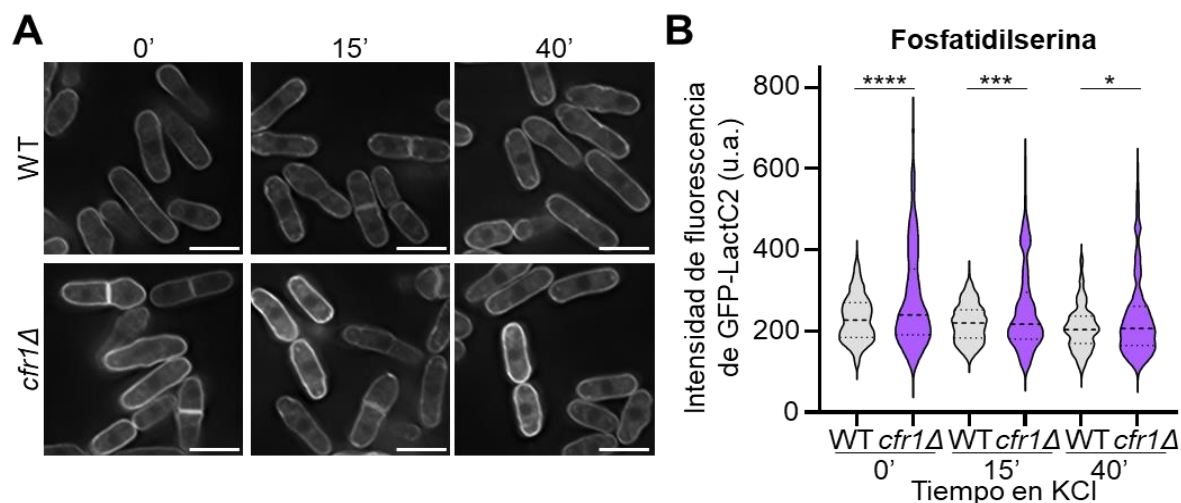


Figura 35. Intensidad de fluorescencia de la sonda de unión a fosfatidilserina GFP-LactC2. (A) Imágenes de células de las cepas WT y *cfr1Δ* que expresan la sonda de unión a fosfatidilserina GFP-LactC2 incubadas en KCl 0,6 M durante los minutos indicados. Las imágenes se capturaron utilizando un sistema DeltaVision. **(B)** El gráfico de violín representa la distribución de los datos obtenidos para la intensidad de fluorescencia. u.a., unidades arbitrarias. Se muestra la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias, determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$.

El PA es una molécula con carga negativa fuerte que presenta mucha afinidad por residuos cargados positivamente. Según el ensayo de la tira de lípidos, Pck2 tiene una gran afinidad por este lípido. El PA está presente en la MP, es el PL más simple, y sirve como precursor para la síntesis de PLs más complejos como los PI, PS, fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilcolina (PC) (Carman and Han, 2011; Ganesan et al., 2015). El PA es convertido a diacilglicerol por la acción de la fosfatasa lipina; por tanto, sería esperable que eliminar esta fosfatasa aumentase la disponibilidad de PA y PLs. Para complementar los resultados obtenidos al sobreexpresar *stt4+*, analizamos el efecto que tendría la delección del regulador de lipina *nem1+* (Makarova et al., 2016) en la asociación de Pck2 con la MP y en la activación de CIP en el WT y un mutante del exómero. Los resultados demostraron que *nem1Δ* suprimía los defectos en la reasociación de Pck2 y Rgf1 con la MP, pero no los defectos en la reasociación de Mkh1 o en la activación de CIP (**Figura 36C-E**). Por tanto, aumentar la expresión de *stt4+* y delecionar *nem1+* corrigen el defecto en la dinámica de asociación de

Pck2 de los mutantes del exómero, pero no su defecto en la activación de CIP debido, al menos en parte, a que otros reguladores de CIP (al menos Rgf1) no se reasocian con la MP.

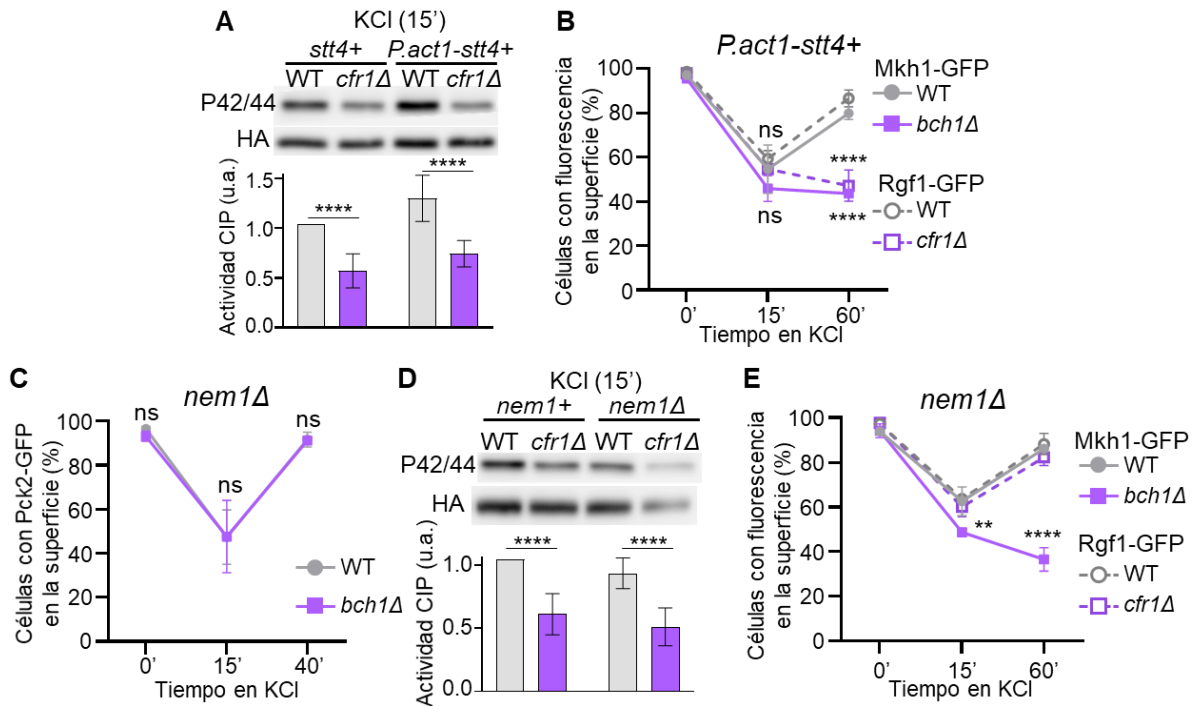


Figura 36. Relación entre lípidos de membrana plasmática, la activación de la ruta CIP y otros activadores de la ruta. (A) Activación de CIP en células WT y *cfr1Δ* que expresan *stt4+* bajo su promotor nativo (*stt4+*) o el promotor de *act1+* (*P.act1-stt4+*), tratadas con KCl durante 15 minutos. (B) Porcentaje de células *P.act1-stt4+* y *P.act1-stt4+ cfr1Δ* (representado en gris y morado, respectivamente) que expresan Mkh1-GFP o Rgf1-GFP (representado en línea sólida y línea punteada, respectivamente), tratadas con KCl 0,6 M durante los minutos indicados, que presentan fluorescencia en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador o el septo (materiales y métodos). (C) Células WT y *cfr1Δ* que expresan Pck2-GFP y tienen la delección *nem1Δ* se trataron y analizaron como en (B). (D) Lo mismo que en (A), pero las células fueron *nem1+* y *nem1Δ*, con y sin exómero. (E) Lo mismo que en (B), pero las células fueron *nem1Δ* y *nem1Δ cfr1Δ* (representado en gris y morado, respectivamente). En (A,D) las gráficas de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). Se muestra la significancia estadística de las diferencias entre las cepas WT y mutante en los mismos puntos temporales de tratamiento. Se utilizaron los tests de comparaciones múltiples de Šidák (C,D) y de Tukey (B,E). ns, no significativo, **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

En conclusión, estos resultados demuestran que Pck2, Rgf1 y Mkh1 tienen requerimientos diferentes para su asociación con la MP, y que la asociación de Pck2 es necesaria, pero no suficiente, para la activación eficiente de la ruta CIP. Además, apoyan la idea de que los mutantes del exómero tienen defectos en la homeostasis de los lípidos de membrana, lo

cual contribuye al defecto en la asociación de Pck2 con la superficie celular y, por tanto, al defecto en la activación de CIP en respuesta a estrés osmótico.

3.6. Los mutantes del exómero acumulan PI4P en el Golgi

El exómero actúa en el TGN, y existe un reservorio de PI4P en el Golgi (Behnia and Munro, 2005). En consecuencia, investigamos cómo afectaba la eliminación del exómero a este reservorio. Para ello, utilizamos la sonda GFP-h\FAPP1(PH), que se une específicamente al PI4P del Golgi (Hoya et al., 2017; Levine and Munro, 2002; Yanguas et al., 2019). Como se muestra en la **Figura 37A**, las células *cfr1Δ* tratadas con KCl 0,6 M durante 15 minutos presentan una fluorescencia de la sonda mayor que las células WT. Una cuantificación en varios puntos temporales demostró que en las células del WT había un incremento en la intensidad de la fluorescencia pequeño pero reproducible, con un pico a los 30 minutos. En el mutante, la fluorescencia aumentaba significativamente a los 15 minutos, y permanecía más alta que en las células WT, y más alta que en las células mutantes sin tratar durante todo el experimento (hasta 90 minutos; **Figura 37B**). La observación de la 1-fosfatidilinositol 4-quinasa del Golgi, Pik1 (Park et al., 2009), marcada con GFP mostró que esta enzima no se acumulaba en el Golgi en estas mismas condiciones (**Figura 37C,D**).

Una explicación que reconcilia el hecho de que el mutante tenga un defecto en el reservorio de PI4P de la membrana y un exceso en el reservorio del Golgi, es que el exómero tenga una función en el transporte de este lípido desde el Golgi hasta la superficie celular. Para explorar esta posibilidad, investigamos si un aumento en la síntesis de PI4P en el Golgi haría que el exómero no fuera necesario para dicho transporte, sino que éste ocurriera por difusión (*bulk flow*), y mitigaría el defecto en la asociación de Pck2 con la membrana, como lo hace la sobreexpresión de *stt4+*. Para abordar esta cuestión expresamos *pik1+* bajo el control del promotor *act1+*. Confirmamos la expresión incrementada de *pik1+* por la presencia de células hinchadas (Sammons et al., 2011; **Figura 34A,B, Anexo I-4**) y por una mayor fluorescencia de la sonda GFP-h\FAPP1(PH) (**Figura 34C**). Como se muestra en la **Figura 37E**, bajo estas condiciones Pck2 es capaz de reasociarse con la MP de forma eficiente 40 minutos después de añadir KCl. Este resultado, unido al hecho de que la

construcción *P.act1-pik1+* produce células con una fluorescencia de la sonda GFP-2xPH(Osh2) significativamente mayor que la del control (**Figura 34A**), confirma que la sobreproducción de PI4P en el Golgi reabastece el reservorio de PI4P en la membrana, lo que facilita la reasociación de Pck2 en la superficie celular. Además, estos resultados apoyan la hipótesis de que el exómero facilita el transporte de PI4P desde el Golgi hasta la PM.

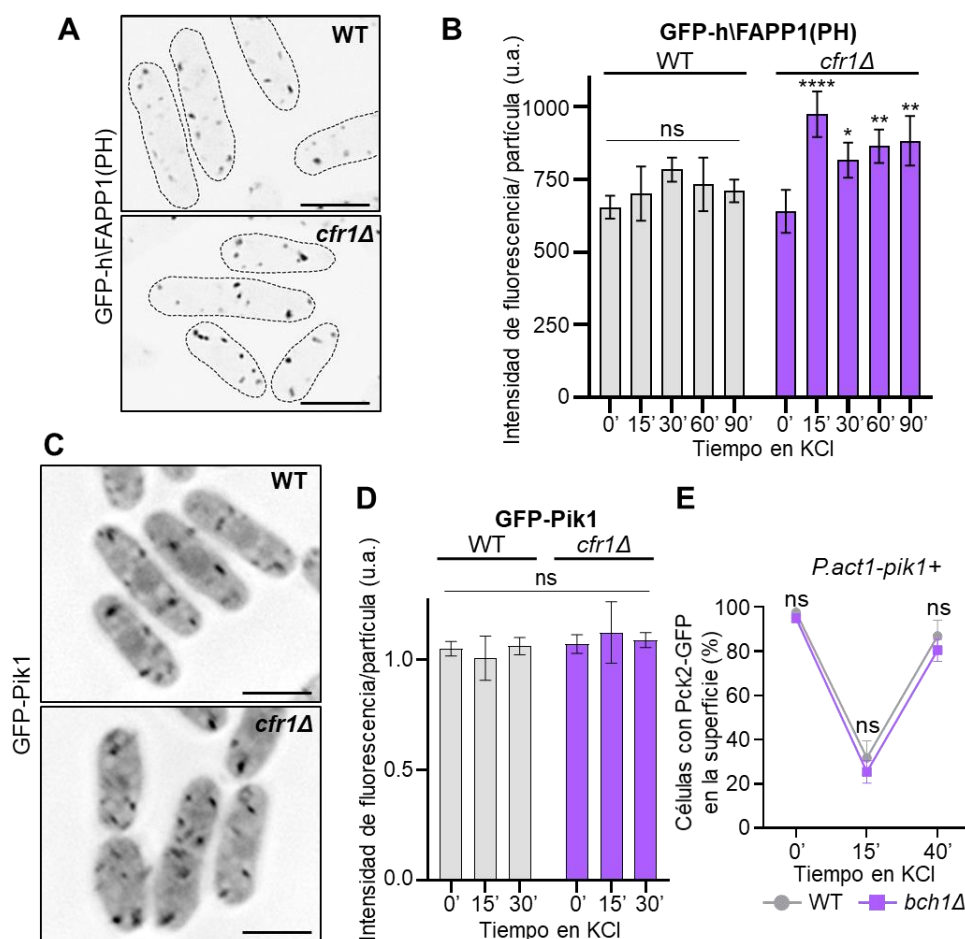


Figura 37. La homeostasis del PI4P en el Golgi está alterada en mutantes del exómero sometidos a estrés osmótico. (A) Imágenes de células de las cepas WT y *cfr1Δ* expresando la sonda GFP-hFAPP1(PH), que se une al PI4P del Golgi. Las células se trataron con KCl 0,6 M durante 15 minutos. Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal Dragonfly. (B) Se cuantificó la fluorescencia de la GFP en las cepas utilizadas en (A), tratadas con KCl 0,6 M durante los minutos indicados. (C) Imágenes de células WT y *cfr1Δ* que expresan Pik1-GFP, capturadas con un sistema Deltavision. (D) Se cuantificó la fluorescencia de la GFP en las cepas utilizadas en (C), tratadas con KCl 0,6 M durante los minutos indicados. (E) Células WT y *cfr1Δ* con Pck2-GFP, y que expresan *pik1+* bajo el promotor de *act1+* se trataron con KCl 0,6 M durante los minutos indicados, y se fotografiaron. Se estimó el porcentaje de células con fluorescencia en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador o el septo (materiales y métodos). En (A,C), barra de escala, 10 μ m. En (B,D), u.a., unidades arbitrarias. En (B,D,E) se representan la media, la desviación estándar y la significancia estadística de las diferencias determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Šidák. ns, no significativo; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

3.7. Papel de los adaptadores de clatrina del TGN en la respuesta CIP

El exómero colabora con los adaptadores de clatrina para mantener la integridad del TGN y los endosomas, y para promover el tráfico vesicular desde estos orgánulos hacia la superficie celular y las vacuolas (Anton-Plagaro et al., 2021; Hoya et al., 2017). Nos preguntamos si los defectos en la activación de CIP son específicos de los mutantes del exómero o son una característica común de todos los mutantes defectivos en el tráfico vesicular desde el TGN. Como se muestra en la **Figura 38A**, la activación de CIP por KCl era poco eficiente tanto en *apm1Δ* (mutante defectivo en el tráfico vesicular hacia la MP porque carece de la subunidad μ de AP-1; Kita et al., 2004) como en *gga21Δ gga22Δ* (defectivo en el tráfico hacia las vacuolas porque carece de los dos adaptadores GGA; (Hoya et al., 2017; Yanguas et al., 2019). Estos resultados muestran que el tráfico vesicular desde el TGN es esencial para la activación efectiva de CIP en respuesta a estrés osmótico.

A continuación, analizamos la distribución de Pck2 en los mutantes *apm1Δ* y *gga21Δ gga22Δ* y la comparamos con la que tenía en las cepas WT y *cfr1Δ*. Observamos que esta distribución era diferente incluso en ausencia de KCl. Para documentar esta observación, dibujamos una línea de 10 μ m a lo largo de los polos celulares como se indica en el panel derecho de la **Figura 38B** (análisis *line-scan*), y representamos gráficamente la intensidad relativa de fluorescencia en cada punto a lo largo de la línea. La distribución de Pck2 era similar en células WT y *bch1Δ* (**Figura 38B**, panel izquierdo). En células *apm1Δ* en interfase, la distribución de Pck2 a lo largo de los polos celulares era similar a su distribución en células WT y *cfr1Δ* (**Figura 38C**, panel izquierdo). Sin embargo, en un 33,8% de las células que estaban en proceso de citocinesis existía fluorescencia de Pck2-GFP en la zona del septo y los laterales de la célula (**Figura 38C**, panel derecho). Esta distribución nunca se observó en células WT, *cfr1Δ* o *gga21Δ gga22Δ*, que sólo presentan fluorescencia de Pck2-GFP en la zona del septo y los polos. En el caso de *gga21Δ gga22Δ*, la distribución de Pck2 a lo largo de los polos era anormal: se localizaba de forma descentrada (distribuida asimétricamente a uno de los lados del polo; células I y II en la **Figura 38D**) o subapical (ausente del centro del polo; célula III en la **Figura 38D**). En conclusión, ambos mutantes tienen algún defecto en la distribución de Pck2.

Con respecto a la asociación de Pck2 con la MP, más del 90% de las células de cada cepa presentaban fluorescencia de Pck2-GFP en los polos celulares cuando crecían en ausencia de KCl (**Figura 39A**). Todas las cepas presentaban una marcada reducción en este porcentaje 15 minutos después de añadir KCl 0,6 M. Tras 40 minutos de choque osmótico, Pck2 se relocizaba a los polos celulares en aproximadamente un 70% de las células WT, *apm1Δ* y *gga21Δ gga22Δ*, pero este fenómeno no ocurría en células *cfr1Δ* (**Figura 39A**).

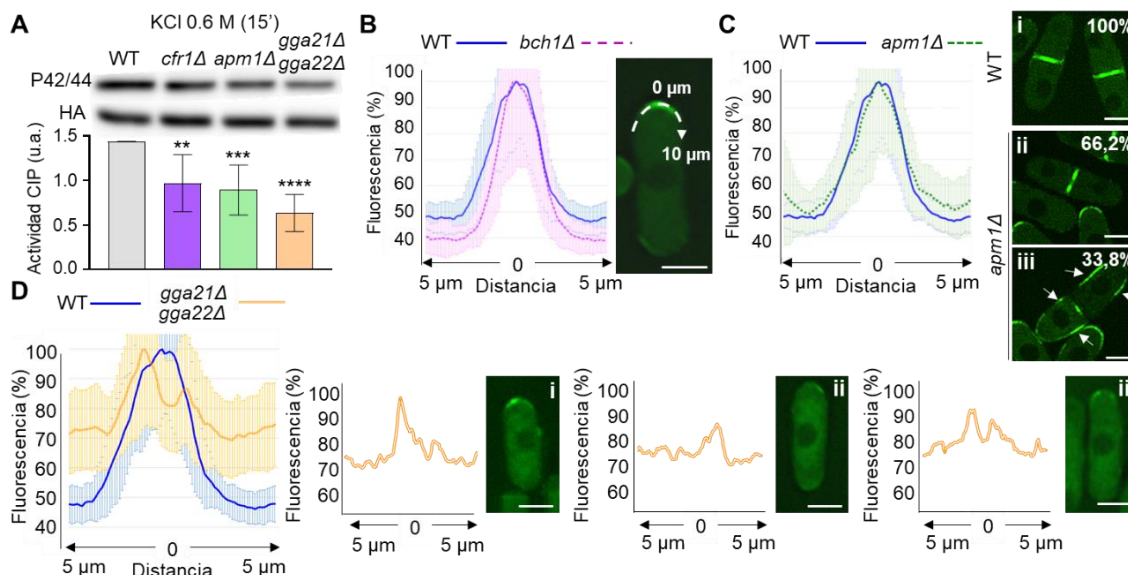


Figura 38. Papel de los adaptadores de clatrina del Golgi en la activación de la ruta CIP y la localización de Pck2 (A) Se analizó la activación de CIP en respuesta a KCl en la cepa WT y en mutantes del exómero (*cfr1Δ*), AP-1 (*apm1Δ*) y los GGAs (*gga21Δ gga22Δ*). (B) Análisis de tipo *line-scan* de la intensidad de fluorescencia de Pck2-GFP a lo largo de la MP de polos celulares en las cepas WT y *bch1Δ* creciendo en YES. El gráfico en el panel izquierdo representa la media y la desviación estándar de los perfiles de las intensidades relativas de todos los valores obtenidos en diferentes puntos de la célula, desde la punta hasta el lateral, como se representa en la imagen (panel derecho). (C) Panel izquierdo, igual que en (B), pero las cepas analizadas fueron la WT y *apm1Δ*. Panel derecho, imágenes de células WT (i) y *apm1Δ* (ii, iii) en proceso de septación. Los números indican el porcentaje de células que presentan fluorescencia de Pck2-GFP sólo en la zona del septo (i y ii) o en la zona del septo y los laterales celulares (indicados con flechas en iii). (D) Panel izquierdo, igual que en (B), pero las cepas analizadas fueron la WT y *gga21Δ gga22Δ*. Los tres paneles de la derecha son perfiles individuales de células con diferentes distribuciones de Pck2-GFP, como se muestra en las correspondientes imágenes (i-iii). Las imágenes fueron capturadas con un microscopio confocal Dragonfly. En (A) las gráficas de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). Se muestra la media, la desviación estándar y la significancia estadística de las diferencias determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. ns, no significativo; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$. u.a., unidades arbitrarias. En (B-D), barra de escala, 5 μm .

Estos resultados demuestran que diferentes defectos en la distribución de Pck2 correlacionan con una activación ineficiente de CIP, y que el defecto en la reasociación de Pck2 con la superficie celular después de estrés osmótico no es común a todos los mutantes deficientes en el tráfico vesicular desde el TGN, sino que es un fenotipo exclusivo de los mutantes del exómero.

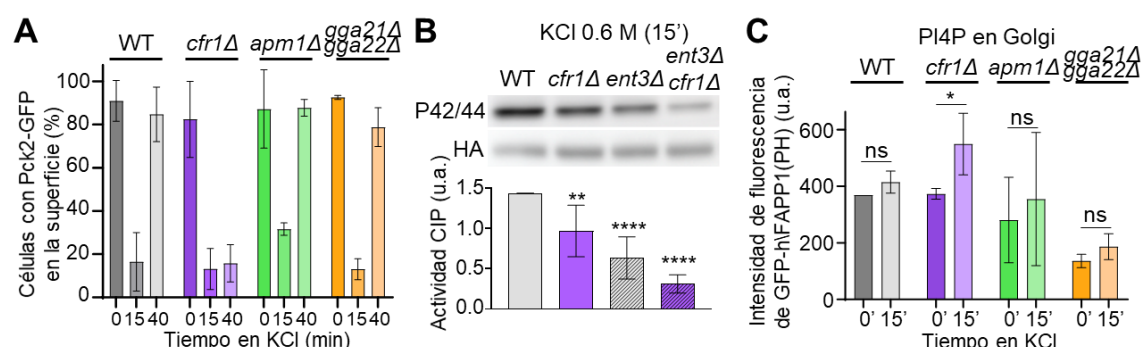


Figura 39. Papel de los adaptadores de clatrina del Golgi en la regulación de Pck2, la activación de la ruta CIP, y la homeostasis del PI4P en respuesta a choque osmótico. (A) Porcentaje de células de las cepas indicadas que muestran fluorescencia de Pck2-GFP en los polos y laterales celulares, pero no en el ecuador celular o el septo (Materiales y métodos). Las células se incubaron en KCl 0,6 M durante los minutos indicados. El experimento se realizó dos veces con resultados similares. (B) Se analizó la activación de CIP en respuesta a KCl en la cepa WT y en mutantes de Cfr1, Ent3, o ambas. (C) Intensidad de fluorescencia de GFP en las cepas indicadas que expresaban la sonda GFP-hFAPP1(PH) como un indicador del nivel de PI4P en el Golgi. Las células se incubaron en KCl 0,6 M durante los minutos indicados. El experimento se realizó tres veces, y se indica la significancia estadística de la diferencia entre los valores de cada cepa a 0 y 15 minutos de tratamiento. En (B) las gráficas de barras representan la actividad CIP calculada como la proporción entre la señal de p42/44 (Pmk1 fosforilada) y la de HA (Pmk1 total). Muestran la media y la desviación estándar. Para determinar la significancia estadística de las diferencias se utilizó el test de comparaciones múltiples de Tukey en (A,B) y el test de comparaciones múltiples de Šidák en (C). ns, no significativo; *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$, ****, $p < 0,0001$. u.a., unidades arbitrarias

A continuación, investigamos si eliminar el exómero y un adaptador de clatrina tendría un efecto aditivo en la activación de CIP. Debido a que las cepas *cfr1Δ apm1Δ* y *cfr1Δ gga21Δ gga22Δ* acumulan muchos defectos, y crecen muy despacio (Hoya et al., 2017), abordamos esta cuestión analizando la activación de CIP en las cepas *ent3Δ* y *ent3Δ cfr1Δ*. Ent3 es una epsina que actúa en la misma ruta funcional que los GGAs porque interacciona físicamente con ellos, depende de ellos para su localización en el Golgi y colabora con ellos en el tráfico vesicular entre el TGN y el PVE (Costaguta et al., 2006; Yanguas et al., 2019). Observamos que la activación de CIP en *ent3Δ* era ineficiente, y que este defecto se veía incrementado en el mutante *ent3Δ cfr1Δ* (Figura 39B), un resultado que indica interacción genética entre

cfr1+ y los adaptadores de clatrina para la activación de CIP, y que sugiere que el exómero y Ent3 regulan CIP por mecanismos diferentes.

Finalmente, analizamos si las células *apm1Δ* y/o *gga21Δ gga22Δ* acumulaban la sonda GFP-h\FAPP1(PH) en el TGN. Como se muestra en la **Figura 39C**, estos mutantes no mostraban este fenotipo, que sí está presente en *cfr1Δ*.

En resumen, estos resultados demuestran que todos los mutantes defectivos en el tráfico vesicular desde el Golgi tienen un defecto en la activación de CIP, pero sólo los mutantes del exómero son defectuosos en la reasociación de Pck2 con la MP y en la acumulación de PIP4 en el TGN

DISCUSIÓN

1. Sensibilidad a K⁺ en los mutantes del exómero

El potasio es el ion más abundante en el interior celular, y varios mutantes de levadura son incapaces de crecer cuando este ion es escaso (Ariño et al., 2014, 2019; Calero et al., 2000; Calero and Ramos, 2003). La mayoría de mutantes descritos como sensibles a altos niveles de K⁺ también son sensibles a sorbitol, lo que demuestra que no son capaces de hacer frente al estrés osmótico, en vez de al iónico. Los mutantes del exómero de *S. pombe* son sensibles a varias concentraciones de diferentes sales de K⁺ pero no a sorbitol, lo cual indica que el exómero es necesario para mantener el crecimiento celular en presencia de sales de potasio.

El exómero es un complejo de proteínas del aparato de Golgi relacionado con el tráfico de determinados *cargos* desde el TGN hacia la MP. Estos *cargos* se quedan retenidos en el TGN en mutantes del exómero (Huranova et al., 2016; Paczkowski et al., 2012, 2015; Paczkowski and Fromme, 2014; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Si algún transportador de entrada de K⁺ fuese un *cargo* del exómero, el fenotipo esperado para los mutantes del exómero sería una reducción en la toma de K⁺ debido a la ausencia de este transportador en la MP. Los siguientes resultados refutan la hipótesis de que la sensibilidad a K⁺ de los mutantes del exómero sea consecuencia de un defecto en la distribución de un transportador/canal concreto en la MP: (1) *cfr1Δ* acumula más K⁺ intracelular que el WT, (2) ninguno de los mutantes carentes de transportadores/canales mostraron el mismo fenotipo que *cfr1Δ*, y (3) en general, los mutantes dobles carentes del exómero y de estos transportadores/canales fueron más sensibles a K⁺ que los correspondientes mutantes simples. Por lo tanto, aunque no podemos ignorar la hipótesis de que un transportador desconocido sea un *cargo* del exómero cuya delección promueva la toma de K⁺ por transportadores de baja afinidad (Bihler et al., 2002), es posible que el fenotipo de los mutantes del exómero sea producido por razones diferentes y/o adicionales.

Debido a que una hiperpolarización de la membrana conlleva una captación inespecífica de iones (Calero et al., 2000; Madrid et al., 1998), la sensibilidad a K⁺ de los mutantes del

exómero podría tener su origen (al menos en parte) en una hiperpolarización de la membrana. De hecho, hemos demostrado que existe esta hiperpolarización de membrana en ausencia del exómero, puesto que los mutantes presentan dos fenotipos íntimamente relacionados con ella: una alta actividad ATPasa y una sensibilidad a higromicina B rescatada por una fuente externa de K^+ .

La acumulación de potasio podría ser un efecto aditivo de un incremento en la captación inespecífica de potasio (debido a la hiperpolarización de la membrana) y un transporte de potasio reducido. Los mutantes del exómero de *S. pombe* acumulan más K^+ y más Cta3 (la bomba de extrusión específica de K^+) que el WT y, curiosamente, los mutantes del exómero de la levadura de gemación acumulan menos K^+ y menos Ena1 (una de las bombas de extrusión homóloga de Cta3) que el WT (Anton et al., 2017; Benito et al., 2002). De esta forma, en ambos organismos la variación del nivel total de K^+ intracelular es opuesta a la esperada de acuerdo con la cantidad de bomba de extrusión disponible. Por lo tanto, si un defecto en estas bombas fuera el responsable de los niveles alterados de K^+ intracelular, este defecto no sería un cambio en el nivel de esa proteína. Nuestros resultados demostraron que Cta3 alcanzaba la MP eficientemente, pero que mostraba una distribución anómala en las regiones de la membrana de crecimiento polarizado. Cabe destacar que los mutantes del exómero de *S. cerevisiae* también son defectuosos en la polarización de Ena1 (Anton et al., 2017). Así, aunque el resultado final en términos de sensibilidad a iones específicos pueda ser diferente debido a la adaptación de cada levadura a un ambiente diferente (Benito et al., 2002), en ambos organismos los mutantes del exómero son defectuosos en la polarización de una bomba de extrusión, lo cual podría contribuir a sus niveles anómalos de K^+ y a su sensibilidad a cationes metálicos alcalinos.

En diferentes organismos, el Ca^{2+} es importante para la homeostasis de otros iones, incluyendo el K^+ (Flatman, 1987; Sarkadi et al., 1985; Seifikhah et al., 2019). La leve sensibilidad a Ca^{2+} y la interacción genética entre mutantes defectuosos en transportadores/bombas/canales de Ca^{2+} y mutantes del exómero demostró una relación entre el exómero y el calcio. El hecho de que la interacción genética sea positiva o negativa dependiendo del transportador sugiere que esta relación es compleja. Nuestros resultados

sugieren que el nivel de Ca^{2+} intracelular es mayor en mutantes del exómero que en el WT, y demostraron que elevar el nivel de K^+ extracelular produce un pico de Ca^{2+} , cuya intensidad es mayor en un mutante *cfr1Δ* que en un WT. Estos resultados demuestran una homeostasis del calcio alterada en condiciones basales y en respuesta a K^+ . De hecho, ya que el calcio es importante para la regulación de los transportadores de K^+ (Capera et al., 2019; Casado et al., 2010), estas alteraciones probablemente contribuyan, a su vez, a la homeostasis del K^+ alterada en los mutantes del exómero. Además, la distribución del canal de calcio Pkd2 es anómala en la MP, donde se observa de forma asimétrica en los sitios de crecimiento polarizado durante un tiempo corto después de la inducción. Debido a que Pkd2 probablemente influye en los niveles de calcio durante la citocinesis (Morris et al., 2019), su distribución anómala en la zona media de la célula podría contribuir a la generación de los septos aberrantes observados en los mutantes incubados en KCl (Hoya et al., 2017).

La presencia de transportadores iónicos, canales y bombas en la MP depende del transporte vesicular (Capera et al., 2019; Mulet et al., 2013). Además, estas proteínas se distribuyen en microdominios de la membrana que les proporcionan un ambiente adecuado para su funcionalidad (Capera et al., 2019; Dart, 2010; Martens et al., 2004). Debido a que la presencia de lípidos específicos define estos microdominios, la composición lipídica de las membranas determina la distribución y la actividad de los transportadores iónicos. Se ha sugerido que la composición lipídica de la MP podría ser importante para el tráfico intracelular adecuado de Pkd2, probablemente debido a la unión de esta proteína a los esteroides de los eisomas (Malla et al., 2023). Nuestros resultados demuestran que la distribución de los esteroides y el PI(4,5)P2 en la MP está alterada en mutantes del exómero expuestos a KCl. En consecuencia, en estas condiciones, Cta3, Pkd2, y probablemente otros transportadores iónicos, así como la ATPasa de membrana Pma1, se localizan en regiones de la membrana con una composición y/o distribución lipídica alterada, lo cual probablemente afecte a su actividad. La distribución y actividad anómalas de bombas y transportadores podrían producir desequilibrios iónicos locales. De hecho, se ha sugerido una función de Pkd2 en la regulación de la señalización por calcio y su homeostasis en el RE

(Koyano et al., 2023). Estos desequilibrios iónicos locales podrían alterar la generación de vesículas y/o su fusión con la MP, lo cual afectaría a la distribución lipídica resultando en un tráfico vesicular defectuoso (Dong et al., 2010; Martin, 2015; Scott and Gruenberg, 2011). De hecho, la delección de Pkd2 altera el tráfico de proteínas (Aydar and Palmer, 2009). Los desequilibrios locales de K^+ y Ca^{2+} y los defectos en el tráfico contribuirían a la sensibilidad a K^+ de los mutantes del exómero de *S. pombe*.

Aparte de su relevancia en la MP, la presencia de transportadores iónicos en la membrana de los orgánulos intracelulares es importante para establecer y mantener gradientes iónicos a lo largo del sistema endosomal (Dong et al., 2010; Scott and Gruenberg, 2011). El tráfico vesicular garantiza la localización de los transportadores iónicos en el orgánulo apropiado (Capera et al., 2019; Zimmermannová et al., 2019) y, como se ha mencionado, la acción de los transportadores influye en el tráfico vesicular. Por lo tanto, es posible que pequeños defectos en el sistema endosomal de los mutantes del exómero (Hoya et al., 2017; Moro et al., 2021) contribuyan a una homeostasis iónica intracelular alterada que, a su vez, alteraría la integridad de los endosomas, el tráfico vesicular y la distribución de los lípidos en la MP. La presencia de concentraciones altas de K^+ externo podría amplificar estos defectos (**Figura 40**), lo cual contribuiría a la sensibilidad a este ion.

En resumen, los mutantes del exómero de *S. pombe* muestran una gran cantidad de defectos leves en varios procesos relacionados con el transporte vesicular y la homeostasis iónica, como se resume en la **Figura 40A**, y estos defectos están potenciados probablemente por la presencia de sales de K^+ . El hecho de que estos defectos sean leves y probablemente locales explica por qué la mayoría de las células *cfr1Δ* se recuperan del estrés cuando son transferidas de un medio con KCl a un medio con niveles normales de K^+ (Moro et al., 2021). El hecho de que muchos de estos procesos están interrelacionados (**Figura 40B**), sugiere la posibilidad de que todos los defectos puedan ser una consecuencia indirecta de la alteración de un único proceso que, a su vez, sea importante para múltiples procesos biológicos. Este proceso único podría ser la homeostasis de los lípidos en las membranas (ver más adelante).

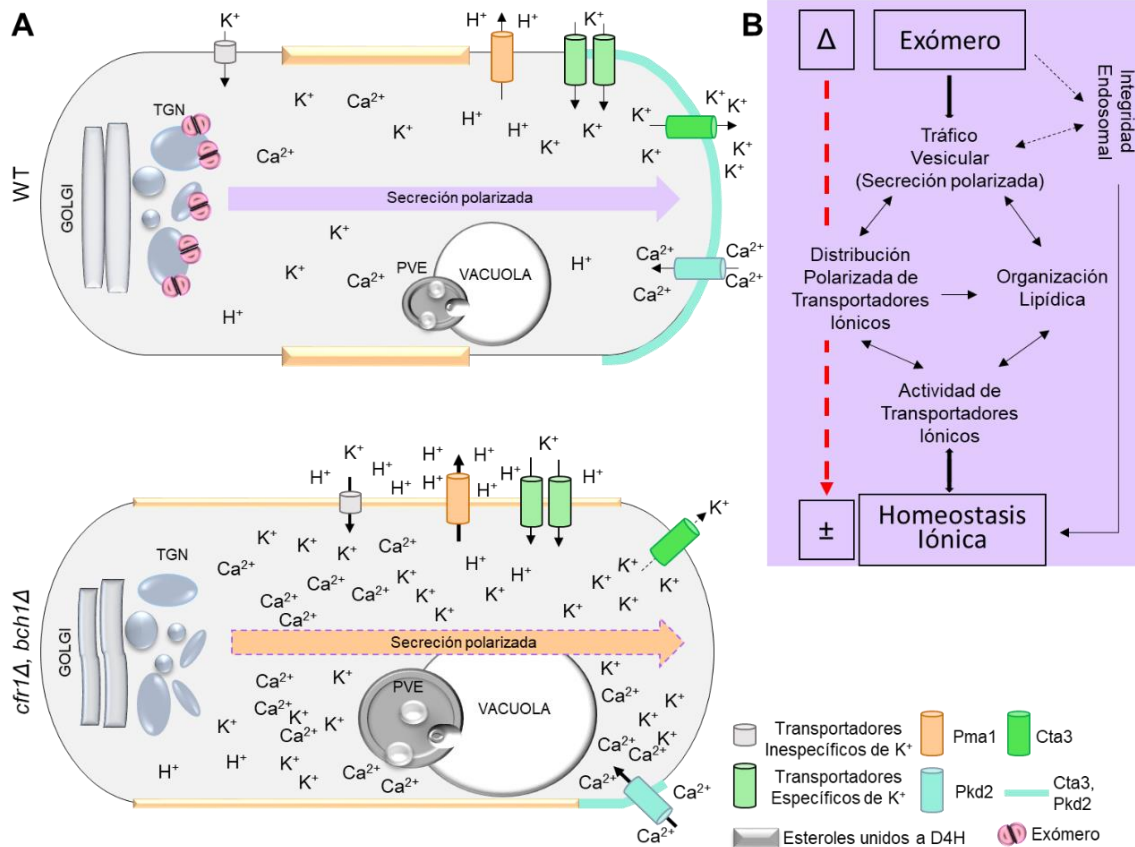


Figura 40. Resumen esquemático de los fenotipos observados en los mutantes del exómero. (A) El dibujo del panel superior (WT) representa una célula silvestre, y el dibujo del panel inferior (*cfr1Δ, bch1Δ*) representa una célula mutante del exómero. En el mutante, hay alteraciones en la morfología del Golgi, el TGN y el PVE, así como en la secreción polarizada, la distribución de Cta3 y Pkd2 y la localización de algunos lípidos de membrana. La ATPasa Pma1 está hiperactiva, resultando en una hiperpolarización de membrana. Esta hiperpolarización, junto con la actividad anómala de Cta3, resultaría en un influjo de K^+ incrementado (probablemente a través de transportadores inespecíficos) y un eflujo reducido, lo cual conllevaría una mayor acumulación de K^+ . Las anomalías en la distribución y/o actividad de Pkd2 (y quizá otros canales de Ca^{2+}) resultarían en un influjo incrementado de calcio y, en su acumulación. Las flechas gruesas indican flujos iónicos que estarían incrementados en el mutante respecto al WT, y las flechas delgadas indican flujos que estarían reducidos. Algunos fenotipos se vieron realzados en presencia de KCl, mientras que otros sólo se observaron bajo estas condiciones. (B) Interacción entre los procesos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis iónica en células WT. El exómero participa en el tráfico vesicular y facilita la secreción polarizada, que resulta en la distribución polarizada de los transportadores iónicos y una adecuada organización lipídica en la MP. La distribución polarizada de los transportadores iónicos y la organización correcta de los lípidos se modulan entre sí, garantizando un tráfico vesicular adecuado, y resultando en una actividad correcta de los transportadores. Además, el exómero es fundamental para la integridad y/o la morfología de los endosomas, ya sea por su regulación del tráfico vesicular o por alguna función desconocida (flechas negras discontinuas). La integridad de los endosomas es necesaria para el tráfico vesicular; por lo tanto, influye en la secreción polarizada. Finalmente, los endosomas participan en el mantenimiento de los gradientes iónicos intracelulares y, por lo tanto, su integridad es necesaria para la homeostasis correcta iónica. En los mutantes del exómero (Δ), la coordinación entre estos procesos está alterada (flecha roja discontinua), lo que conduce a una homeostasis iónica alterada ($\pm$).

La interacción genética entre los mutantes del exómero y los mutantes que hemos analizado indica que la ausencia del exómero afecta a varios procesos. Además, nuestros resultados con mutantes dobles y triples indican que, en varios casos, los efectos son aditivos. *cfr1+* fue el único supresor encontrado en un cribado de supresores multicopia diseñado para identificar genes que rescatasen la sensibilidad de *cfr1Δ* a KCl (resultados sin publicar). Este hecho apoya la idea de que el exómero pueda alterar un único proceso que, a su vez, altere varios aspectos importantes para mantener el crecimiento en presencia de concentraciones altas de K⁺. De este modo, varios aspectos del tráfico vesicular y la homeostasis iónica convergerían en el exómero, y este complejo proteico actuaría como un nodo donde conectan y se coordinan la homeostasis iónica y los mecanismos de regulación del tráfico vesicular. En cualquier caso, tampoco se puede descartar totalmente que el exómero altere varios procesos de manera independiente.

2. El exómero y la secreción polarizada

El papel fundamental de los fosfoinosítidos en el tráfico vesicular se ha documentado ampliamente (Hammond and Burke, 2020; Schink et al., 2016), por lo que una desregulación en la homeostasis lipídica puede, muy probablemente, conducir a problemas en la organización y el funcionamiento del sistema de secreción vesicular.

Chs3, Fus1 y Pin2 son proteínas transmembrana de *S. cerevisiae* que se localizan en los sitios de crecimiento polarizado. Se consideran *cargos bona fide* del exómero porque interaccionan con componentes del exómero y se quedan retenidos en el TGN en ausencia de este complejo proteico (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Rockenbach et al., 2012; Sanchatjate and Schekman, 2006; Santos and Snyder, 1997, 2003; Trautwein et al., 2006). Skg6 es una proteína transmembrana capturada en un cribado de tipo *pull-down* diseñado para identificar *cargos* del exómero (Ritz et al., 2014). Sorprendentemente, Skg6 se localiza en la MP en mutantes del exómero, un resultado que llevó a la conclusión de que no es un *cargo* de este adaptador (Ritz et al., 2014). Posteriormente, análisis de sensibilidad a cationes de mutantes del exómero demostraron que un porcentaje significativo de células no presentaban a Ena1 o al transportador de triptófano Tat2 en la MP de las yemas (Anton

et al., 2017; Anton-Plagaro et al., 2021). Además, un análisis de la regulación de la síntesis de quitina por el exómero de otros organismos demostró que, en los mutantes del exómero de *C. albicans*, parte de la quitina sintasa CaChs3 presentaba una localización intracelular, y que la fracción de la enzima que llegaba a la MP era apenas detectable en las yemas y las puntas de las hifas (Anton et al., 2018). En esta tesis doctoral demostramos que los mutantes del exómero de *S. pombe* tienen defectos en la distribución polarizada de Cta3 y Pkd2. Estos resultados, junto con el hecho de que (1) *S. pombe* alberga la forma funcional más simple de exómero, cuya ChAP está muy relacionada con la ancestral (Martín-García et al., 2011; Ramirez-Macias et al., 2018); (2) Cta3 es muy cercana evolutivamente a la ATPasa de K⁺ original (Benito et al., 2002); y (3) la función del exómero como adaptador de cargo es una adquisición evolutivamente reciente (Ramirez-Macias et al., 2018), sugieren firmemente que la función ancestral del exómero estaba más relacionada con la secreción polarizada de este tipo de proteína que con su salida del Golgi. En particular, la distribución subapical/asimétrica de Ena1, Cta3 y Pkd2 en los mutantes es evidente sólo en los tiempos cortos después de la inducción. Por lo tanto, sería interesante analizar la distribución de Skg6 y otros *cargos* potenciales bajo las mismas condiciones. Esto clarificaría si la regulación de la secreción polarizada por el exómero es frecuente en proteínas transmembrana que no dependan de él para salir del TGN, o si está restringido a un pequeño grupo de proteínas que incluyen varios transportadores.

Después de la llegada a la superficie celular, estas proteínas se distribuirían a lo largo de la MP de la zona media, polo o yema mediante difusión lateral (Valdez-Taubas and Pelham, 2003), lo que explicaría por qué su defecto en polarización no sería detectado después de un tiempo largo tras la inducción. La pérdida del módulo de polaridad es un proceso finamente regulado por Sty1 en respuesta a varias fuentes de estrés, entre ellas el estrés osmótico (Salat-Canela et al., 2021). En nuestros mutantes la ruta dependiente de Sty1 responde correctamente. Por lo tanto, es posible que las proteínas lleguen a la MP de una forma similar en el WT y en los mutantes, y que la distribución anómala de los esteroides, el PI(4,5)P₂, PI4P, y otros lípidos como la PS, ralentice su difusión lateral en los mutantes, lo que daría lugar a su localización defectuosa transitoria.

Algunas funciones del exómero posibles y mutuamente no excluyentes en la secreción polarizada podrían ser facilitar (1) la correcta organización de los microdominios lipídicos en el TGN (ver más adelante) y/o la interacción entre estos microdominios y las proteínas que promueven la formación de vesículas; (2) la oligomerización de los *cargos*; (3) el contacto entre la vesícula y la miosina tipo V; o (4) el establecimiento de los sitios de crecimiento polarizado. Futuros estudios deberían abordar estas posibilidades.

3. El exómero, la ruta de integridad celular y la homeostasis lipídica

Nuestros resultados demuestran que, en la levadura de fisión, la respuesta eficiente de la ruta CIP a estrés osmótico requiere de la acción del exómero. El hecho de que observemos este defecto en respuesta a concentraciones altas de sales de potasio y a sorbitol es sorprendente, porque el crecimiento de los mutantes del exómero es defectuoso en placas con KCl 0,6 M pero no con sorbitol 1,2 M (Hoya et al., 2017; Moro et al., 2021). Este resultado indica que otros defectos en los mutantes, como la homeostasis alterada del K⁺ y la distribución anómala de la bomba de K⁺ Cta3, podrían contribuir a la sensibilidad.

En ausencia del exómero, la asociación defectuosa de Pck2 con la MP después del choque inicial contribuye a una respuesta ineficiente de CIP, y un defecto en la homeostasis de los PIs es responsable de la asociación reducida. Esto es consistente con el hecho de que estos lípidos regulan las PKCs (Nelsestuen and Bazzi, 1991). La eficiencia de la respuesta de CIP correlaciona con el nivel de actividad de Its3 (Kabeche et al., 2015; **Figura 32C**), lo cual a priori sugiere que el principal PI implicado es el PI(4,5)P2. Sin embargo, hemos encontrado que el PI4P y el PA juegan un papel importante en el proceso. Estos lípidos podrían contribuir a la asociación de Pck2 con la MP a través de unión directa, unión con otras proteínas que estabilicen a Pck2, o asegurando un entorno lipídico adecuado para la actividad de Pck2. Además, el PA podría contribuir a la activación de CIP proporcionando un sustrato para la síntesis de PLs, que podrían unirse a Pck2, Rgf1 y/o Mkh1.

Los PIs no se distribuyen de manera uniforme en todas las membranas celulares. Así, el PI(4,5)P2 es abundante en la MP, y el PI4P es abundante en el Golgi, pero también está presente en la MP. El reservorio de PI4P de la MP es el precursor de PI(4,5)P2 y participa en

la endocitosis, en el transporte no vesicular de lípidos, en la homeostasis de la membrana, y en algunas rutas de señalización celular. El reservorio de PI4P del Golgi participa en la secreción polarizada y en la señalización (Batrouni and Baskin, 2021; Behnia and Munro, 2005; De Matteis et al., 2005; Posor et al., 2022). Sin embargo, en células de mamíferos, el PI4P y el PI(4,5)P2 son determinantes independientes de identidad de la MP, y se ha visto que el PI4P contribuye a algunas funciones que antes se habían atribuido específicamente al PI(4,5)P2 (Hammond et al., 2012). Los reservorios de PI4P se sintetizan *in situ* por las 1-fosfatidilinositol 4-quinasas y, por tanto, la contribución del PI4P del Golgi en la MP no está clara. En células de mamíferos, el mantenimiento del PI(4,5)P2 de la MP y la regulación de los canales iónicos dependen de los reservorios de PI4P de la MP y el Golgi (Dickson et al., 2014). Por otra parte, en la levadura de gemación, el reclutamiento de la GEF de Rho1, Rom2, a la MP y la consecuente activación de la cascada de MAPK mediada por PKC, requiere del reservorio de PI(4,5)P2 dependiente de Stt4, pero no del dependiente de Pik1 (Audhya and Emr, 2002). En *S. pombe*, el PI4P sintetizado por Stt4 es el sustrato que origina el PI(4,5)P2 en la MP (Willet et al., 2023). Nosotros hemos demostrado que en *S. pombe* el reservorio de PI4P de la MP no es sólo un precursor de PI(4,5)P2, sino que es un determinante importante para la asociación de Pck2 con la MP y la señalización de CIP. Además, el reservorio del Golgi contribuye a la señalización reabasteciendo al reservorio de la MP después del choque osmótico.

¿Por qué los mutantes del exómero son defectuosos en la señalización de CIP cuando cambia la presión osmótica? Los cambios en la osmolaridad alteran la tensión y las propiedades físicas de las membranas. Además, la composición lipídica de la membrana cambia en respuesta a estrés osmótico en la levadura de gemación y en plantas (Bonangelino et al., 2002; Guo et al., 2022). Nosotros hemos observado varios cambios en la distribución de lípidos en *S. pombe* tratada con altas concentraciones de KCl, y estos cambios están exacerbados en los mutantes del exómero. Por tanto, es posible que el estrés osmótico induzca una alteración en la MP que en los mutantes de exómero sea más deletérea o sea reparada menos eficientemente. En células epiteliales de *Caenorhabditis elegans*, el Golgi participa en un mecanismo de reparación de MP que se activa en respuesta

al daño producido por estrés mecánico. Este mecanismo induce un incremento en el transporte de membranas derivadas del Golgi hasta la herida, lo que proporciona PI4P para una generación local incrementada de PI(4,5)P2 para estabilizar las membranas (Meng et al., 2023). En *S. pombe*, concentraciones altas de KCl inducen un cambio en la distribución del PI(4,5)P2 (Kabeche et al., 2015), que es más evidente en ausencia del exómero, donde los lípidos se asocian en cúmulos durante tiempos más largos (Figuras 24C,E, 28A y 32D). Este agrupamiento prolongado podría reducir su accesibilidad. Proponemos un modelo (Figura 41) en el que el choque osmótico resultaría en una reducción en la cantidad o accesibilidad del PI(4,5)P2.

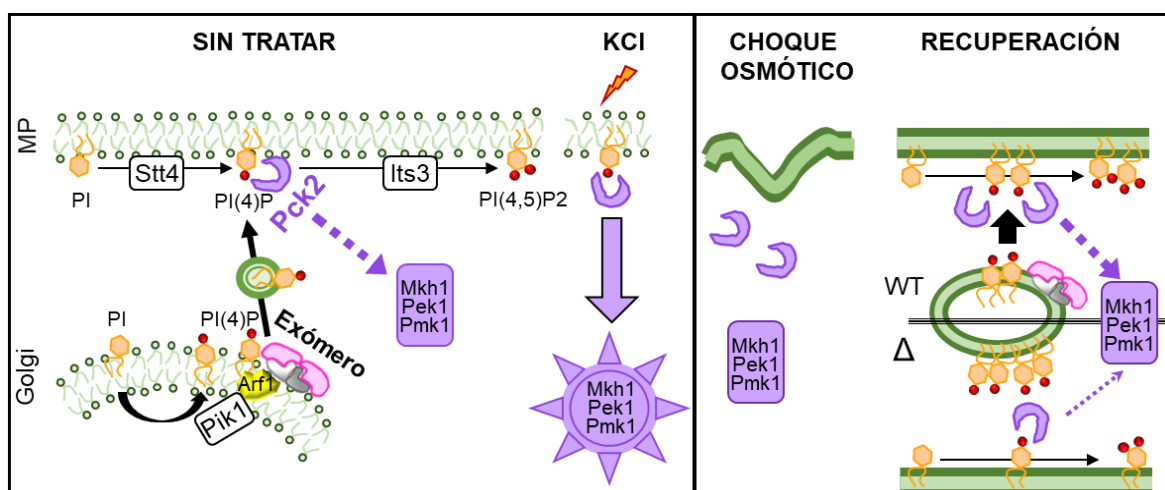


Figura 41. Modelo especulativo para explicar el papel del exómero en la homeostasis del PI4P y la regulación de CIP. Panel izquierdo, bajo condiciones basales (SIN TRATAR), la 1-fosfatidilinositol 4-quinasa Stt4 fosforila al PI para generar PI4P en la MP. Este PI4P es sustrato para la 1-fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa Its3, que produce PI(4,5)P2. Pck2 se une al PI4P y activa al bloque de MAP quinasa de CIP en respuesta a estrés (KCl). En el Golgi, la 1-fosfatidilinositol 4-quinasa Pik1 fosforila PI para generar PI4P. El exómero, que interacciona con Arf1 y la membrana del Golgi, modularía la transferencia de PI4P a la MP. Panel derecho, el estrés osmótico alteraría las propiedades de la MP, y Pck2 se disociaría de la superficie de los polos celulares (CHOQUE OSMÓTICO). Después del choque inicial, las células WT se adaptarían a la presencia de KCl (RECUPERACIÓN); Its3 sintetizaría PI(4,5)P2 a partir del PI4P generado en la MP por Stt4. Bajo estas condiciones, habría un transporte incrementado de PI4P desde el Golgi hacia la MP que mediaría la re-asociación de Pck2 con la MP. En ausencia del exómero, este transporte sería ineficiente, lo que resultaría en una acumulación de PI4P en el Golgi y una escasez de este lípido en la MP. Esto haría que se redujera la reasociación de Pck2 con la MP y, por tanto, también la señalización de CIP.

Consecuentemente, las células requerirían un mayor suministro de este lípido, que sería obtenido a partir de la fosforilación local de PI4P por Its3. Esta respuesta aguda resultaría en una gran demanda de PI4P, y en una escasez de este lípido para otras funciones. Bajo

estas circunstancias, el PI4P del Golgi, sintetizado por Pik1, sería transportado hacia la MP por un mecanismo facilitado por el exómero. El suministro incrementado de PI4P también serviría como un punto de anclaje para Pck2, que se reasociaría a la MP y estaría disponible para nuevas rondas de activación de CIP.

4. Adaptadores de clatrina del TGN

El patrón de sensibilidades a estrés de los mutantes defectuosos en adaptadores de clatrina, cuyos endosomas están alterados (Hoya et al., 2017; Kita et al., 2004; Moro et al., 2021; Yanguas et al., 2019), demuestra que su MP está hiperpolarizada. Esto concuerda con el papel del sistema endosomal en la homeostasis iónica y del pH, y con los resultados que demuestran una relación entre los defectos en el sistema endosomal y la sensibilidad a higromicina B (Banuelos et al., 2010; Ejzykowicz et al., 2017; Scott and Gruenberg, 2011). Aun así, el crecimiento de los mutantes carentes del exómero y de adaptadores asociados a clatrina en presencia de varias sales y sorbitol es diferente. Por lo tanto, el fenotipo de los mutantes del exómero es probablemente el resultado de una combinación de diferentes defectos.

Los adaptadores de clatrina que operan en el Golgi también interactúan con lípidos y Arf1, y algunos resultados sugieren que podrían colaborar o competir con el exómero (Anton-Plagaro et al., 2021; Hoya et al., 2017). Nuestros resultados demuestran que estos adaptadores también regulan la ruta CIP en respuesta a estrés osmótico y, teniendo en cuenta la interacción genética entre *ent3Δ* y *cfr1Δ*, cuanto más defectuoso es el tráfico desde el TGN, menos efectiva es la activación de CIP. Esta visión es consistente con el papel del Golgi en la señalización (Cancino et al., 2013; Cancino and Luini, 2013). Sin embargo, esta interacción genética, junto con el hecho de que las células carentes de estos adaptadores no tienen una reasociación de Pck2 defectuosa con la MP y no acumulan PI4P en el Golgi, sugiere firmemente que el exómero y los adaptadores de clatrina actúan a través de mecanismos diferentes, y que la regulación del transporte de PI4P desde el Golgi podría ser una función específica del exómero.

5. El exómero como elemento regulador

El exómero es un complejo proteico con propiedades de cubierta vesicular y adaptador de *cargo*, que se une a lípidos y proteínas y facilita el transporte de proteínas transmembrana que se localizan en los sitios de crecimiento polarizado (Bonifacino, 2014; Paczkowski et al., 2012; Paczkowski and Fromme, 2014, 2016; Ritz et al., 2014; Rockenbauch et al., 2012; Sanchatjate and Schekman, 2006; Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997, 2003; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Nosotros hemos encontrado que el exómero de *S. pombe* regula Pck2, Rgf1 y Mkh1, que no son proteínas transmembrana, pero se asocian a lípidos y muestran una distribución polarizada. Además, regula la distribución lipídica, en particular en respuesta a estrés osmótico. Concretamente, hemos puesto de manifiesto la existencia de un defecto en la homeostasis de PI4P en mutantes de exómero. El mecanismo por el cual el exómero modula el transporte de PI4P sigue siendo una incógnita y requiere estudios adicionales. El exómero interacciona con lípidos y con Arf1 (Paczkowski et al., 2012; Paczkowski and Fromme, 2014, 2016; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Por lo tanto, podría estar involucrado en el fraccionamiento o empaquetamiento de los lípidos durante la formación de vesículas (Bankaitis et al., 2012; Patterson et al., 2008) y/o en la modulación de Arf1.

En un enfoque diferente, es posible que la acumulación de PI4P en el TGN sea debida a un mal funcionamiento de las proteínas Osh41/Osh42 (homólogas de Osh4 de *S. cerevisiae* y de OSBP de mamíferos) en ausencia del exómero, ya que está descrito que las OSBP de mamíferos consumen un alto porcentaje del PI4P presente en el TGN para realizar su función transportadora de colesterol (Mesmin et al., 2017).

En la levadura de gemación, la proteína Osh4 está relacionada con la regulación de la secreción en el TGN (y más concretamente con el transporte de esteroides), y su localización en el Golgi depende de la producción de PI4P por la quinasa Pik1 (Balla et al., 2023). Esta proteína posee un dominio ORD capaz de unir tanto esteroides como PI4P (de Saint-Jean et al., 2011). Además, su homóloga en mamíferos (OSBP) se localiza en los sitios de unión RE-TGN, donde se une al colesterol del RE, siendo este su *cargo* preferido debido a la ausencia

de PI4P por la actividad de la fosfatasa Sac1. El colesterol (u otros esteroides dependiendo del organismo) puede ser liberado del dominio ORD en la membrana del TGN, donde los niveles de PI4P son altos, propiciando la unión del dominio con PI4P y previniendo la unión de colesterol. La rápida hidrólisis del PI4P en el RE por la fosfatasa Sac1 permite que el dominio ORD se vuelva a unir a colesterol para empezar el ciclo otra vez (Balla et al., 2023). Este sistema podría estar alterado en un mutante del exómero de *S. pombe*, que acumula más PI4P en el TGN. El exceso de este lípido podría ocasionar un mayor transporte anterógrado hacia la MP y retrógrado hacia el RE, aumentando los niveles de PI4P en este compartimento y desfavoreciendo el sistema de transporte de esteroides, que quizá se tendrían que transportar de otras formas menos eficientes. Esto resultaría en la distribución anómala de los esteroides que hemos detectado en los mutantes del exómero, en particular en presencia de KCl.

Por otra parte, en un mutante puntual de Osh4 de *S. cerevisiae* Y97F, la proteína aumenta su unión al TGN de forma dependiente de PI4P. Esto provoca una interferencia en las funciones de señalización del PI4P y conlleva alteraciones dramáticas en el metabolismo de los esfingolípidos y un transporte defectuoso hacia la MP de varias permeasas de aminoácidos y NH_4^+ (Mousley et al., 2012). La mayor cantidad de PI4P que se acumula en el Golgi en los mutantes del exómero de *S. pombe* podría estar simulando este efecto del mutante puntual de Osh4, lo que ayudaría a explicar varios de los fenotipos de los mutantes del exómero, como la alteración en la distribución de esteroides y PI(4,5)P₂, la distribución alterada de Cta3 y Pk2 y la inestabilidad de Pck2 en la MP. Los hechos de que en un análisis piloto de proteómica Cfr1 haya mostrado unión a Osh41 en presencia de KCl, que el mutante *osh41Δ* sea sensible a KCl, y que el mutante doble *bch1Δ osh41Δ* sea más sensible que cada mutante sencillo (resultados previos del laboratorio), sugieren una relación funcional entre el exómero y Osh41.

Los mutantes del exómero tienen defectos leves en múltiples procesos: la señalización en respuesta a estrés osmótico, la síntesis de la pared celular, la citoquinesis, la conjugación, la actividad de la ATPasa de MP, la secreción polarizada, la homeostasis del calcio y potasio,

y la distribución de los lípidos (este trabajo, Anton et al., 2017; Cartagena-Lirola et al., 2006; Hoya et al., 2017; Moro et al., 2021; Santos et al., 1997; Santos and Snyder, 1997, 2003).

En esta tesis doctoral hemos puesto de manifiesto la existencia de una función del exómero en el mantenimiento de la homeostasis lipídica, que podría explicar su papel en la regulación de la secreción polarizada, la homeostasis iónica y la señalización. De acuerdo con esto, la función del exómero debería ser contemplada no sólo desde una perspectiva centrada en las proteínas, sino también desde una perspectiva centrada en los lípidos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los mutantes del exómero presentan defectos en la polaridad de la membrana plasmática, y en la homeostasis del K^+ y del Ca^{2+} .
2. La distribución de la bomba de extrusión de K^+ Cta3 y del canal de Ca^{2+} Pkd2 es anómala en los mutantes del exómero en los momentos tempranos tras su expresión.
3. La distribución de algunos lípidos de la membrana plasmática está alterada en los mutantes del exómero.
4. Los mutantes del exómero son defectuosos en la activación de la ruta CIP en respuesta a estrés osmótico, aunque el exómero no es un componente integral de la ruta CIP.
5. La dinámica de asociación de Rgf1, Pck2 y Mkh1 con la membrana plasmática tras un choque osmótico está alterada en los mutantes del exómero.
6. El defecto en la activación de CIP de los mutantes del exómero correlaciona con un defecto en la localización del activador Pck2.
7. El defecto en la dinámica de asociación de Pck2 con la membrana se suprime incrementando la síntesis de PI4P y otros fosfolípidos en la membrana plasmática, e incrementando la síntesis de PI4P en el Golgi.
8. Los mutantes del exómero tienen menos PI4P en la membrana plasmática, y lo acumulan en el Golgi, lo cual indica que el exómero participa en el transporte de PI4P desde el Golgi hacia la membrana plasmática.
9. Aunque todos los mutantes defectivos en el tráfico vesicular desde el Golgi tienen un defecto en la activación de CIP, el exómero participa en un mecanismo de regulación de la ruta que es exclusivo. Este mecanismo garantiza una cantidad adecuada de PI4P, necesario para que Pck2 se asocie a la membrana plasmática.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos empleados

En este trabajo se han empleado dos microorganismos diferentes:

- La bacteria *Escherichia coli* se utilizó en los trabajos rutinarios de clonación molecular.
- La levadura *Schizosaccharomyces pombe* se utilizó como modelo experimental para realizar los experimentos.

Las cepas empleadas en este trabajo, sus características genéticas y su procedencia se detallan en el **anexo II**.

Los mutantes *cfr1Δ* y *bch1Δ* se han usado indistintamente como mutantes del exómero porque se sabe que cada una de las proteínas es esencial para que la otra se localice en el TGN y, por lo tanto, para que haya un exómero funcional (Hoya et al., 2017). Aunque no se puede obviar la posibilidad de que cada proteína ejerza una función independiente del exómero, los dos mutantes presentan los mismos fenotipos en todos los procesos estudiados hasta el momento. En los trabajos iniciales se usó el mutante *cfr1::his3+* como parental en cruces genéticos, dado que la recombinación homóloga en el *locus cfr1+* es muy ineficiente, lo que dificultaba la obtención de cepas por transformación con casetes de delección. Por el contrario, la recombinación homóloga en el *locus bch1+* es muy eficiente, por lo que, una vez se comprobó que ambos mutantes tenían los mismos fenotipos, se pasó a construir las cepas nuevas utilizando casetes de delección *bch1::KAN*, *bch1::NAT* o *bch1::HPH*. Los experimentos cuyos resultados son más concluyentes de este trabajo se han realizado con cepas *cfr1Δ* y *bch1Δ* y se han obtenido los mismos resultados.

2. Medios y condiciones de cultivo

Todos los medios de cultivo empleados se prepararon con agua destilada (milli RO) y se esterilizaron en el autoclave. Los correspondientes medios sólidos se prepararon mediante la adición de agar al 2%.

2.1. Medios y condiciones de cultivo para *E. coli*

Para el crecimiento de esta bacteria se utilizó de manera rutinaria el medio LB (*Lysogeny Broth*) compuesto por: bacto triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1%. El pH de este medio de cultivo oscila entre 7,2 y 7,4; el ajuste del pH se realiza antes de la esterilización en autoclave. Para la selección de clones resistentes a antibióticos se suplementaron los medios con 100 µg/ml de ampicilina (Roche) o con 50 µg/ml de kanamicina (Formedium).

Para su cultivo en medio líquido las células de *E. coli* se incubaron en tubos de ensayo o en matraces Erlenmeyer con agitación orbital a 200 rpm a una temperatura de 37°C. Para el crecimiento en medio sólido las células se incubaron en placas de Petri en estufas a 37°C.

2.2. Medios y condiciones de cultivo generales para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de la levadura de fisión se describieron por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1991) . En este trabajo se han usado los siguientes:

YES (*Yeast Extract Supplemented*): Es un medio rico compuesto por glucosa al 3%, extracto de levadura al 0,5% y una mezcla con cantidades iguales de adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo a 1,125 g/L. Previamente a su esterilización en autoclave el pH del medio se ajusta a 5,6. Este medio se ha utilizado de manera general para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Para la selección de determinadas cepas el medio YES se suplementó con geneticina (Formedium) a 120 µg/mL, con nourseotricina (WERNER BioAgents) a 50 µg/ml o con higromicina (Formedium) a 200 µg/ml, según fuese necesario.

Medio mínimo (EMM, *Edinburgh Minimal Media*): compuesto por glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22% y NH₄Cl al 0,5%. El pH está ajustado a 5,6. Además, este medio lleva sales, vitaminas y minerales de acuerdo con lo especificado previamente (Moreno et al., 1991). El EMM se utilizó para la selección de cepas con determinadas auxotrofías y para cultivar aquellas que portaban plásmidos. En estos casos el EMM se suplementó con 225 mg/L de uracilo, lisina, adenina, leucina y/o histidina según fuera necesario. El EMM con todos los suplementos se denominó EMM completo.

Para el crecimiento de *S. pombe* en medio sólido se utilizaron placas de Petri que se incubaron en estufas a la temperatura correspondiente. En general, para el crecimiento en cultivos líquidos, las levaduras se incubaron a 28°C en matraces con agitación a 200 rpm. En este caso los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de crecimiento. Para ello se realizó un preinóculo el día anterior al experimento y se dejó crecer durante toda la noche. A la mañana siguiente se analizó la concentración de células en el cultivo midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro. Por las curvas de calibración realizadas previamente en el laboratorio se estableció que una densidad óptica (D.O.) de 1 equivalía a 10^7 células/ml de *S. pombe*. Teniendo en cuenta estos datos y el tiempo de generación de la levadura, se reinoculó el cultivo a la concentración de células necesaria para realizar el experimento con las levaduras creciendo en fase exponencial ($D.O. \leq 1$).

2.3. Medios y condiciones de cultivo especiales para *S. pombe*

En algunos casos fue necesario añadir a los medios de cultivo diferentes compuestos químicos para la inducción de estrés (KCl, CaCl₂, NaCl, LiCl y sorbitol, de Sigma; KNO₃, de Merck; CH₃CO₂K, de Panreac; higromicina B, de Formedium; FK506, de Tocris; MgCl₂, de Fisher; o caspofungina, de MSD). Las condiciones de cultivo (tiempos y temperaturas) en presencia de estos compuestos se indican en cada experimento. Todos los compuestos se añadieron al medio después de la esterilización del mismo.

Para analizar la respuesta a estrés inducida por sorbitol, las células se recogieron por filtración, los filtros se introdujeron en matraces con YES suplementado con sorbitol (Sigma) 1,2 M y se incubaron a 28°C. Para analizar la respuesta a estrés hipotónico, células creciendo en YES con sorbitol 0,8 M se recogieron por filtración, se introdujeron en matraces con YES y se incubaron a 28°C.

2.4. Ensayos de crecimiento en gota

Este tipo de experimento se usa para analizar y comparar el crecimiento de distintas cepas ante diferentes tipos de estrés. Además, permiten observar las interacciones génicas existentes entre ellas. Para realizar estos ensayos se partió de cultivos líquidos creciendo en

fase exponencial y se igualó su D.O.₆₀₀ a 1. A continuación, se realizaron 5 diluciones seriadas $\frac{1}{4}$, hasta obtener un total de 6 concentraciones decrecientes de células. Posteriormente, usando un replicador (Sigma) se colocó una gota de cada concentración sobre las placas con el medio de cultivo correspondiente. Las placas se incubaron a diferentes temperaturas o en presencia de diferentes fuentes de estrés a 32°C durante 2-5 días dependiendo de las condiciones.

3. Conjugación y aislamiento de ascosporas al azar

Con el objetivo de conseguir cepas con características de dos estirpes parentales se llevaron a cabo cruces genéticos. La inducción de la conjugación se realizó en placas de EMM con la mitad de los suplementos que se usan para el crecimiento vegetativo, ya que para que se inicie este proceso es necesario que haya unas condiciones limitantes de nutrientes. Cuando se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h^+ y h^-), se mezcló la misma cantidad de células de cada progenitor. Si una de las cepas parentales era homotálica (h^{90}), se utilizó menor cantidad de ella para disminuir la probabilidad de conjugación entre sus propias células.

Tras unos 2-4 días de incubación (dependiendo de las cepas) las células que han conjugado adecuadamente generan ascas con 4 ascosporas cada una. Una vez transcurrido este tiempo se realizó el aislamiento y selección de las ascosporas al azar (Forsburg and Rhind, 2006). Para ello se tomó una pequeña muestra del cruce y se resuspendió en 1 ml de agua estéril al que se añadieron 5 μ l de extracto enzimático β -glucuronidasa (Roche). Esta mezcla se incubó durante aproximadamente 16 horas a temperatura ambiente en agitación. Este tratamiento degrada las paredes de las células vegetativas y favorece la liberación de las esporas. Después se realizaron diluciones y se sembraron en medio rico YES. Una vez que las colonias crecieron en este medio se seleccionaron aquellas que poseían el genotipo de interés mediante su crecimiento en medios selectivos, a través de su análisis por PCR y/o mediante su observación al microscopio.

4. Procedimientos generales de biología molecular

4.1. Vectores utilizados

4.1.1. Vectores de *E. coli*

pGEX-2T-TEV (Addgene #80630, McCullough et al., 2008): Es un plásmido de expresión bacteriana de 5650 pares de bases (pb) que contiene el gen de resistencia a ampicilina para la selección en bacterias, el origen de replicación *ColE1* y un fragmento del represor de lactosa *lacI*, que se une al operón *lac* para inhibir la traducción *E. coli*. Esta inhibición puede ser aliviada añadiendo lactosa o isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, dispone de un fragmento *LacZ α* de la β -galactosidasa, una *tag* de glutatión S-transferasa (GST) y un sitio de corte TEV (*Tobacco Etch Virus*). Utilizado para expresar Pck2 marcada con GST en *E. coli*, para analizar su unión a lípidos dispuestos en tiras de membranas hidrofóbicas.

4.1.2. Vectores de *S. pombe*

pINTH1 (Fennessy et al., 2014): Es un plásmido integrativo construido a partir del vector pUC19 de *E. coli*. Tiene el gen de resistencia a ampicilina como marcador de selección en bacterias. Además, contiene un módulo de ADN con la mitad de la secuencia codificante del gen de resistencia a higromicina, seguida del promotor de *nmt1+*, de un MCS, del terminador de *nmt1+*, del gen de resistencia a nourseotricina y de la otra mitad del gen de resistencia a higromicina. Este módulo (tras hacerlo lineal cortando con la enzima *NotI*) se puede integrar en el genoma de una cepa que posee el gen de resistencia higromicina integrado artificialmente en una región intergénica de su genoma (Fennessy et al., 2014).

pINTH81 (Fennessy et al., 2014): Es un plásmido integrativo construido a partir del vector pUC19 de *E. coli* de la misma forma que el pINTH1. La única diferencia entre este plásmido y el anterior es la ausencia en el MCS de un sitio de corte para la enzima de restricción *SmaI*. Debido a esta gran similitud, se utilizó de forma indistinta con el pINTH1.

pIJK148 (McLeod et al., 1987): Es un vector de 5,3 kb que contiene el gen *leu1+* de *S. pombe* como marcador de selección en levadura, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación f1, el gen de la enzima β -galactosidasa, el origen de replicación *ColE1* de *E.*

coli y un MCS con 19 sitios de restricción únicos. Este plásmido carece de la secuencia de replicación autónoma *ars1* por lo que no se puede autoreplicar en levadura. Se usa para la integración de secuencias de ADN en el locus *leu1+* de *S. pombe*. Para que la integración del plásmido tenga lugar es necesario hacerlo lineal digiriéndolo con una enzima de restricción. De manera rutinaria se ha utilizado *Tth111I*, que corta dentro del gen *leu1+*. Tras esto se puede transformar una cepa con la mutación *leu1-32*. Al integrarse el plásmido en esta cepa se reconstituye una copia del gen *leu1+* silvestre, por lo que se pueden seleccionar los transformantes en un medio sin leucina.

4.2. Obtención de ADN

Para la extracción rápida y a pequeña escala de ADN plasmídico de *E. coli* (mini-preps) se empleó el método de la rotura alcalina descrito previamente (Zhou, 1990). En este método las células se lisan por la adición de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). La precipitación del ADN se produce por la adición de isopropanol y sales. Cuando fue preciso obtener ADN de mayor pureza y en mayor cantidad se empleó un kit comercial (QIAprep® Spin Miniprep Kit, QIAGEN).

La extracción de ADN plasmídico y genómico de *S. pombe* se realizó de acuerdo a los protocolos descritos previamente por Moreno y colaboradores (Moreno et al., 1991) y en el manual de laboratorio de Sambrook y colaboradores (Sambrook, 2001).

4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN por PCR se llevó a cabo en los termocicladores MyCycler™ (BioRad) y Multigene Mini™ (Labnet International). De manera general se usó una mezcla de reacción (20 µl de volumen final) que contenía los 4 desoxinucleótidos trifosfato a una concentración final de 0,2 mM cada uno, MgCl₂ a 2,5 mM, los oligonucleótidos usados como cebadores a 1 µM, 0,25 unidades de la polimerasa (BIOTAQ™ de Bioline), el tampón suministrado por dicha casa comercial y un volumen variable de ADN molde en función de si era genómico o plasmídico. El volumen se completó con agua. En aquellos casos en los que la PCR se utilizó para amplificar un fragmento de ADN que se iba a clonar para su expresión en *S. pombe*, se utilizó en la reacción una enzima con capacidad

correctora de errores (VELOCITY DNA Polymerase, BIONE) siguiendo las especificaciones de la casa comercial. Para realizar PCR de fusión se utilizó la enzima PrimeSTAR de Takara. Durante la reacción tiene lugar un primer paso de desnaturalización del ADN molde a 94°C, un segundo paso de anillamiento de los cebadores a la temperatura óptima variable en función de su secuencia y, por último, la extensión de las hebras, utilizándose 1 minuto de incubación a 72°C por cada kb de ADN a amplificar. Cada uno de estos pasos se repite de manera cíclica a lo largo del proceso entre 30 y 35 veces, dependiendo del experimento.

4.4. Manipulación general de ADN

Los protocolos utilizados para la manipulación de ADN se recogen en distintos manuales (Howland, 1996; Sambrook, 2001). Además de las distintas indicaciones de estos manuales, se tuvieron en cuenta las recomendaciones de las casas comerciales suministradoras del material.

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o por tratamiento con enzimas de restricción se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Hispanlab). Estos se elaboraron a diferentes concentraciones (entre 0,7% y 2%), según el tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon con tampón TAE (Tris acetato 40 mM, EDTA 1mM) al que se añadió Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH).

Para purificar los fragmentos de ADN después de su separación en geles de agarosa se utilizó el kit comercial NucleoSpin® de MACHEREY-NAGEL. Las ligaciones de fragmentos de ADN purificados se realizaron utilizando la enzima del fago T4 (Fermentas) e incubando la mezcla de ligación a 16°C durante 12-16 horas. Posteriormente esta mezcla de ligación se utilizó para transformar *E. coli*.

4.5. Secuenciación

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó en el servicio de secuenciación de la empresa CENIT, que emplea un secuenciador automático capilar 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems). La técnica usada se basa en modificaciones del método descrito por Sanger y colaboradores (Sanger et al., 1977). Se usan didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos que son detectados por un láser. Las secuencias obtenidas se observaron en

forma de cromatograma, junto con las letras correspondientes a cada nucleótido, con el software informático Chromas.

4.6. Plásmidos construidos

En este trabajo se han construido una serie de plásmidos que se han utilizado para integrar en el genoma algunos genes bajo la expresión de promotores de otros genes. Las secuencias utilizadas para hacer estas construcciones se detallan en el **Anexo III**. Los fragmentos de DNA se liberaron por digestión enzimática y se utilizaron para transformar células de levadura. Todas las construcciones se comprobaron mediante digestiones con enzimas de restricción y secuenciación de ADN, y su correcta integración se comprobó por PCR.

4.7. Delección de genes y marcaje de proteínas en su *locus*

Las delecciones de distintos genes y los marcajes en el extremo C-terminal de las proteínas se hicieron transformando la cepa correspondiente con distintos módulos de ADN amplificados por PCR como está descrito (Bähler et al., 1998). Para la amplificación se usaron oligonucleótidos de unos 100 pares de bases, de los cuales 80 eran homólogos con las dianas del genoma y 20 con los distintos módulos. Tras la transformación se comprobó por PCR que la integración había ocurrido correctamente.

Para marcar proteínas en su extremo N-terminal, se amplificaron por PCR tanto la GFP como la ORF correspondiente flanqueadas por los sitios de restricción adecuados y se clonaron en el vector pINTH1 (Fennessy et al., 2014) flanqueadas por el promotor y el terminador de *nda2+*.

4.8. Transformación de *E. coli*

La transformación de células competentes de *E. coli* con mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado anteriormente (Kushner, 1978). Este método promueve la entrada de ADN en las células bacterianas sometiéndolas a un choque térmico. Para amplificar plásmidos ya construidos se empleó un método simplificado del anterior conocido como “transformación del minuto” (Golub, 1988).

4.9. Transformación de *S. pombe*

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

5. Procedimientos generales de bioquímica

5.1. Cálculo de concentración intracelular de potasio

Para estimar la concentración intracelular de potasio las células se cultivaron en medio rico YES hasta alcanzar una absorbancia de 0,6-0,7 a 660 nm, se centrifugaron durante 5 minutos a 1900 x g, se resuspendieron en medio YES y se incubaron a 30°C durante 90 minutos. Se tomaron alícuotas centrifugando durante 5 minutos a 700 x g y 4°C y se lavaron dos veces con 10 ml de una solución de MgCl₂ 20 mM fría. Los precipitados se resuspendieron en 0,5 ml de MgCl₂ 20 mM y los iones se extrajeron calentando las células a 95°C durante 15 minutos. Después de centrifugar, se analizaron alícuotas del sobrenadante con un espectrómetro de absorción atómica (SensAA) en modo atomización con llama (Ríos et al., 2013).

5.2. Cuantificación de la actividad ATPasa

La actividad de la ATPasa de la membrana plasmática se cuantificó midiendo el consumo de ATP determinando la cantidad de fosfato inorgánico con molibdato de amonio (Pérez-Valle et al., 2010).

6. Análisis y detección de proteínas

6.1. Obtención de extractos proteicos

Para la obtención de extractos proteicos se utilizaron 30 ml de cultivos en fase exponencial de crecimiento ($D.O_{600}=0,8-1$). Las células se recogieron por centrifugación (900 x g) y se lavaron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20% frío. A continuación, se resuspendieron en 50 µl de la misma solución y se añadieron 500 µl de bolitas de vidrio de 0,4-0,6 mm de diámetro (Braun Biotech International). Las células se rompieron en una Fast-Prep Fp120 (Savant Bio101) con tres ciclos de 16 segundos a una velocidad de 6 m/s y

a 4°C, con una incubación de 5 minutos en hielo entre los pulsos de rotura. Posteriormente se le añadieron a cada tubo 400 µl de TCA al 5% frío y se agitó en el vortex para lavar las bolitas de vidrio. Tras esto, se transfirieron los extractos celulares a un tubo nuevo y se centrifugaron durante 10 minutos (900 x g) a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en una solución con SDS al 2% y 0,3 M de Tris Base y se calentó durante 5 minutos a 95°C. Después las muestras se centrifugaron durante 2 minutos (17000 x g) y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Posteriormente se determinó la cantidad de proteína mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976) usando el reactivo de BioRad *Protein Assay Dye Reagent* y se igualó la concentración de proteínas de las muestras. Seguidamente se añadió a las muestras el tampón de carga 2X Laemmli *sample buffer* (Tris HCl pH 6,8 50 mM, SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,143 M, glicerol al 10% y azul de bromofenol) y se calentaron de nuevo 5 minutos a 95°C.

Para algunas proteínas específicas, como puede ser Pmp1-GFP o Rgf1-GFP, los extractos se obtuvieron lavando con 1 ml de agua fría tras la centrifugación y añadiendo 200 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Tritton-X100 0,1%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 1 µg/ml, leupeptina/pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM). El resto de pasos fueron iguales que en el método descrito anteriormente.

6.1.1. Obtención de extractos proteicos para el análisis de activación de Pmk1 y Sty1

En este caso, para evitar la estimulación por rozamiento y fuerzas de compresión que se generan durante la centrifugación (Soto et al., 2007), las células se recogieron mediante filtración de 30 ml de cultivo y posterior lavado de los filtros con 1 ml de PBS (*Phosphate-buffered saline*; NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄ 100 mM, KH₂PO₄ 176 mM) frío. Las células precipitadas se congelaron con hielo seco y, una vez finalizada la recogida de todas las muestras, se descongelaron en hielo.

Las células se lisaron añadiendo 200 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 0,1%, glicerol 10%, aprotinina 1 µg/ml, leupeptina/ pepstatina 1 µg/ml y PMSF 1 mM) junto con bolitas de vidrio y aplicando dos pulsos de 16 segundos a una velocidad de 5,5 m/s en Fast Prep.

La purificación y la detección de Pmk1 y Sty1 totales y activadas se realizó según el protocolo descrito (Madrid et al., 2006), con algunas modificaciones.

Se incubó 1 mg de proteína en 200 μ l de tampón de extracción durante 90 minutos en rotación, en frío y en presencia de 50 μ l de bolas de níquel (Ni-NTA His-Bind Resin[®], Novagen[®], Millipore). Las cepas utilizadas en estos experimentos llevan versiones de las quinasas Pmk1 o Sty1 marcadas con un epítipo HA seguido de 6 histidinas, que tienen afinidad por el níquel de las bolas, permitiendo la purificación de las quinasas. Tras la incubación, las bolas se lavaron tres veces con 1 ml de Tris-HCl 1M pH 8, se añadieron 30 μ l de 2X Laemmli *sample buffer* y se calentaron de nuevo 5 minutos a 95°C.

6.2. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Los extractos proteicos se cargaron en geles de poliacrilamida:bisacrilamida 29:1 (BioRad), donde las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se emplearon geles de distinto porcentaje de poliacrilamida en función del tamaño de la proteína a analizar. La electroforesis se realizó a 100-150 V durante 1-2 horas utilizando el tampón de carrera Laemmli (Tris base 3 g/l, glicina 14,4 g/l y SDS 5%, pH 8,3).

Tras la electroforesis las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF, ImmobilonTM-P, Millipore) para su posterior detección con anticuerpos. La transferencia se llevó a cabo utilizando el sistema Mini Trans Blot (BioRad) con el tampón de transferencia Tris/Glicina (Tris base 3 g/l, glicina 14,4 g/l y etanol al 10%, pH 8,3) durante 2 horas a 100 V. Para evitar el calentamiento del tampón se mantuvo la cubeta en un baño de agua con hielo durante todo el proceso.

6.3. Inmunodetección de proteínas

Las membranas con las proteínas se bloquearon mediante incubación durante 1 hora con una solución de leche desnatada en polvo (Sveltesse-Nestlé) al 5% disuelta en TBST (Tris-HCl 0,25% pH 7,6, NaCl 0,9% y Tween-20 al 0,25%). En el caso de los análisis de activación de Pmk1 y Sty1, para bloquear las membranas y diluir los anticuerpos, α -P42/44 y α -P38 respectivamente, se utilizó una solución de BSA (Sigma) al 3% en TBST, para evitar posibles

interferencias de las fosfatasas de la leche con la señal de fosforilación de las quinasas. Tras el bloqueo las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente, diluido en la misma solución de bloqueo, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se lavaron las membranas 3 veces durante 10 minutos con TBST para eliminar el anticuerpo que no se hubiera unido. Después se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente diluido en la solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron otros 3 lavados de 10 minutos con TBST y se procedió al revelado. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **tabla I**.

El revelado se llevó a cabo mediante la detección de la actividad peroxidasa (enzima ligada al anticuerpo secundario) por quimioluminiscencia. Para ello se empleó el kit WesternBright™ ECL (Advansta). Cuando la intensidad de la señal fue muy fuerte se utilizó el kit ECL™ Start (GE Healthcare). En ambos casos se siguieron las instrucciones proporcionadas por la casa comercial. La quimioluminiscencia se detectó en un sistema Vilber Fusion FX (Vilber GmbH).

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
Primarios		
α -GFP monoclonal (JL-8)	1: 3000	BD Living Colors
α -tubulina monoclonal (B-5-1-2)	1:10000	Sigma
α -HA monoclonal (12CA5)	1:8000	Roche
α -Pma1 policlonal	1:10000	Goossens et al., 2000
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (#9211)	1:2000	Cell Signaling Technology
Phospho-P42/44 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (#9101S)	1:2000	Cell Signaling Technology
Secundarios (conjugados con peroxidasa HRP)		
α -IgG de ratón (#170-6515)	1:10000	BioRad
α -IgG de conejo (RG-96)	1:10000	Sigma
α -GST (#RPN1236)	1:6000	Cytiva

Tabla I. Anticuerpos utilizados en este trabajo.

6.4. Ensayo de interacción proteína-lípido

Para comprobar la interacción de la proteína Pck2 con una serie de lípidos, se expresó y purificó GST-Pck2 de acuerdo a lo descrito previamente (Encinar del Dedo et al., 2015), con modificaciones. Se expresó la proteína de fusión a partir del plásmido pGEX-2T-TEV en la cepa BL21 de *Escherichia coli*, que se incubó a 28°C durante 16 horas en presencia de IPTG (Merck). La proteína se purificó con bolas de glutatión-Sefarosa 4B (Cytiva) y se cuantificó. Una fracción (2,5 µg) de la proteína total se utilizó para interaccionar con los lípidos presentes en una tira de lípidos de membrana (Echelon), procediendo posteriormente a la inmunodetección con un anticuerpo α -GST conjugado con peroxidasa de la misma forma que se describe en apartados anteriores. Para bloquear las tiras y diluir el anticuerpo α -GST se utilizó una solución de BSA al 3% en TBST.

7. Técnicas microscópicas

7.1. Microscopía de campo claro y contraste de fases

La microscopía en campo claro y en contraste de fases se utilizó para la observación rutinaria de las células presentes en diferentes cultivos líquidos o sólidos. Con este fin se usaron los microscopios Leica DM RXS con cámaras Leica (DFC 320 y DFC 350 FX), y Zeiss Axiophot con cámaras de SPOT Imaging Solutions.

7.2. Microscopía de fluorescencia

Para la adquisición de imágenes de muestras con fluorescencia se utilizaron los siguientes microscopios, en función del experimento realizado (ver pies de cada figura):

- Microscopio Olympus IX71 (objetivo 100x, apertura numérica 1,40) equipado con un sistema personal Delta Vision (Applied Precision), con una fuente de iluminación LED y una cámara digital CoolSnap HQ2 (Photometrics). Las imágenes se adquirieron utilizando el programa informático DeltaVision Softworx Resolve3D asociado al sistema. Tras la adquisición, las imágenes se procesaron con el programa de deconvolución Softworx DV (Applied Precision).

- Microscopio confocal Spinning-Disk Olympus IX-81 (objetivo 100x, apertura numérica 1,40) equipado con un módulo confocal CSU-X1 (Yokogawa) y una cámara Evolve (Photometrics). Las imágenes se adquirieron usando el software Metamorph. Para los experimentos de colocación se adquirieron series de 3 planos en Z a intervalos de 0,2 μm en la zona media de la célula. Las imágenes mostradas son el plano medio de cada serie, salvo que se indique lo contrario en la figura.
- Sistema confocal Spinning-Disk Dragonfly (ANDOR) con microscopio Nikon Ti2-E (objetivo 100x, apertura numérica 1,45) equipado con una cámara sCMOS Sona 4.2B-11 (ANDOR) y un módulo SRRF (*Super Resolution Radial Fluctuation*). Las imágenes se adquirieron y deconvolucionaron utilizando el programa Fusion (ANDOR), y se realizó su análisis 3D con el software IMARIS (Bitplane).

En todos los casos se utilizaron los filtros adecuados para dejar pasar la luz de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas.

A no ser que se indique lo contrario, las imágenes son proyecciones promedio (AVG) de una serie de 3 planos en Z a intervalos de 0,2 μm del plano medio celular. Para el análisis cuantitativo de las imágenes se utilizaron estas proyecciones. De manera rutinaria las muestras se recogieron por centrifugación (1 minuto a 3000 rpm), se dispusieron en un portaobjetos y se fotografiaron al microscopio. Cuando las imágenes tuvieron que ser capturadas a tiempos cortos después de un choque osmótico, las células se fijaron con lectina en una cámara μ -Slide VI 0.5 con fondo de vidrio (Ibidi #80607), que fue rellenada con YES. Posteriormente, se retiró el medio YES de los canales, se rellenaron con YES + KCl y las imágenes se fueron capturando a lo largo del experimento.

En los experimentos de microscopía *time-lapse* realizados por Q. Chen (*Department of Biological Sciences, University of Toledo, Toledo, OH, United States*) se añadieron 30 μl de células en fase de crecimiento exponencial a una cámara Ibidi cubierta previamente con 50 μl de lectina (Sigma, L2380) 50 $\mu\text{g/ml}$. Tras una incubación de 12 minutos a temperatura

ambiente para permitir la unión de las células a la lectina, se añadieron 2ml de YES con 0,6M KCl. Este tipo de experimentos se llevaron a cabo en los microscopios confocales.

7.2.1. Fluorescencia directa con proteínas de fusión

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria* (Chalfie et al., 1994). Esta proteína posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz de longitud de onda de 488 nm. Además, existe una proteína roja fluorescente (RFP) que procede del coral *Dicosoma striata* y emite fluorescencia roja cuando se excita con luz de una longitud de onda de 584 nm. Existen variantes mejoradas de ambas proteínas. En este trabajo se utilizó la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), más brillante que la GFP original, y la mCherry, más brillante y estable que la RFP original.

Todas estas proteínas mantienen su capacidad de emitir luz cuando se expresan de manera heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello se suelen usar como sistema de detección *in vivo* de la expresión y localización subcelular de proteínas. Para usar esta técnica se fusiona en fase la secuencia de ADN que codifica la proteína fluorescente con la del gen de la proteína objeto de estudio. Con esta construcción se transforman las células de interés que expresarán la proteína de fusión. Esta se puede observar utilizando un microscopio de fluorescencia.

Para marcar el PI4P en el TGN se utilizaron las sondas mCherry-FAPP1(PH) (Hoya et al., 2017; Yanguas et al., 2019) y GFP-h\FAPP1(PH) (Levine and Munro, 2002). Las sondas GFP-2xPH(Osh2) (Stefan et al., 2011) y GFP-h\GAP1IP4BP(PH) (Hammond et al., 2009; Moro et al., 2021), se usaron, respectivamente, para detectar la distribución de PI4P y PI(4,5)P2 en la MP. La sonda GFP-LactC2 se utilizó para detectar la PS en la cara interna de la MP (Curto et al., 2014; T. Yeung et al., 2008). Todas estas sondas, clonadas en pINTH1 bajo el control del promotor y el terminador de *nda2+*, se liberaron del plásmido por digestión con *NotI* y se integraron en el locus *hph.171* (Fennessy et al., 2014). La sonda mCherry-D4H, utilizada para detectar la distribución de esteroides en la membrana (Marek et al., 2020), y GCaMP6s,

utilizada para detectar variaciones en la concentración intracelular de calcio (Poddar et al., 2021), fueron regalos de S. Martin y Q. Chen, respectivamente.

7.3. Procesamiento y análisis de las imágenes adquiridas

Todas las imágenes se analizaron y cuantificaron utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, United States). Para el análisis tridimensional se utilizó el software IMARIS (Bitplane).

Para estimar el tamaño de los puntos intracelulares se dibujó una ROI (*Region Of Interest*) circular alrededor de cada punto, y se analizó el área. Para estimar la intensidad de fluorescencia de estructuras intracelulares se definió un umbral específico y se utilizó la herramienta de ImageJ “*Particle Analysis*”.

Para determinar la intensidad de fluorescencia de proteínas asociadas a la membrana plasmática, se realizaron *line-scans* dibujando una línea transversal a la superficie celular y se analizó la intensidad de fluorescencia máxima a lo largo de dicha línea. Se analizó específicamente la fluorescencia máxima para evitar el ruido de la señal del fondo.

Para determinar la distribución de Pck2 en los polos de las diferentes cepas por análisis *line-scan*, se estimó la intensidad de fluorescencia dibujando una línea de 10 μm a lo largo de los polos y analizando la media y la desviación estándar de los valores relativos de intensidad de fluorescencia en cada punto de la línea. Estos valores se normalizaron con respecto al valor máximo y se representaron gráficamente. Para cada experimento se analizaron un mínimo de 20 polos. Para contar células se utilizó el *plug-in* de ImageJ (*National Institutes of Health*) *Cell Counter*.

Para estimar el porcentaje de células en las que Pck2-GFP se relocizaba en la superficie celular después del choque osmótico, contamos las células con señal de fluorescencia en ese punto temporal. Observamos que, después del choque, algunas células presentaban fluorescencia en los laterales de la célula en vez de en los polos. Contabilizamos aquellas células que mostraban señal en los polos y/o en los laterales de la célula, y no

contabilizamos aquellas que mostraban señal en el ecuador celular y el septo, como se explica en la **Figura 42**.

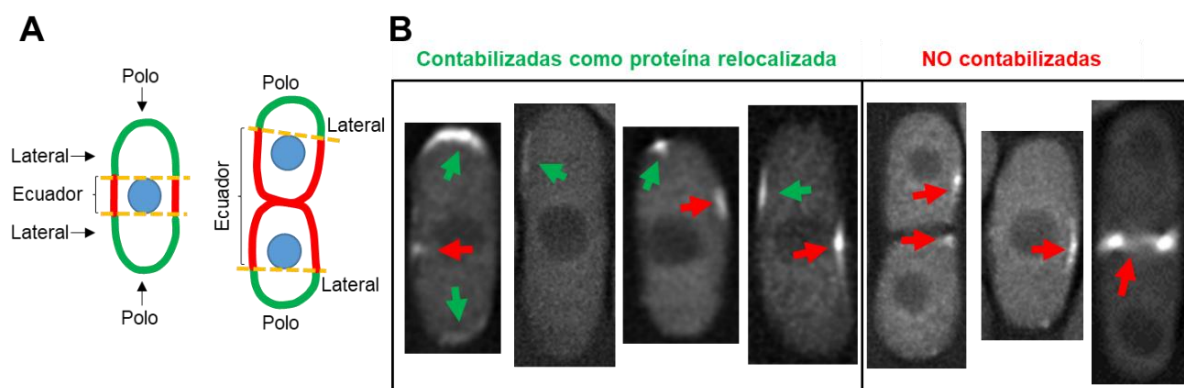


Figura 42. Criterio seguido para contabilizar células positivas en la relocalización de las proteínas tras el choque osmótico. (A) Dibujo que muestra diferentes zonas de la célula. Para células que expresan Rgf1-GFP, Pck2-GFP o Mkh1-GFP, consideramos a la proteína como relocalizada tras el choque osmótico cuando la fluorescencia se observó en los polos celulares o los laterales de la célula, pero no cuando se observó en el ecuador celular (definido por la posición del núcleo; célula de la izquierda). En el caso de células en proceso de citocinesis, consideramos el ecuador celular como la zona comprendida entre la posición de los núcleos, incluida la zona del septo (célula de la derecha). El color verde representa las zonas de la célula donde la presencia de proteína se contabilizó como relocalizada, y el color rojo representa las zonas de la célula donde la proteína no se contabilizó. Una célula se contabilizó como positiva siempre que mostrase fluorescencia en cualquiera de las zonas representadas en verde, aunque también presentara fluorescencia en zonas en rojo. (B) Ejemplos de células con proteína que se consideró relocalizada (flechas verdes) o no relocalizada (flechas rojas).

Para los análisis de colocalización se utilizaron imágenes de 16-bits de dos canales diferentes capturadas con el microscopio confocal Spinning Disk. En estos experimentos se analizó la coincidencia de las partículas de un canal con las del otro en un único plano, para lo cual se utilizó el programa ImageJ.

8. Análisis estadístico de los resultados

Todos los datos sujetos a cuantificación son los resultados de un mínimo de tres experimentos, a no ser que se especifique lo contrario. Los datos se analizaron inicialmente en Excel (Microsoft) y posteriormente se visualizaron, se analizaron estadísticamente y se representaron gráficamente en GraphPad Prism.

Para los datos de microscopía, se analizaron un mínimo de 120 células/partículas procedentes de tres imágenes de experimentos diferentes. El test estadístico usado en cada análisis se especifica en el pie de figura correspondiente.

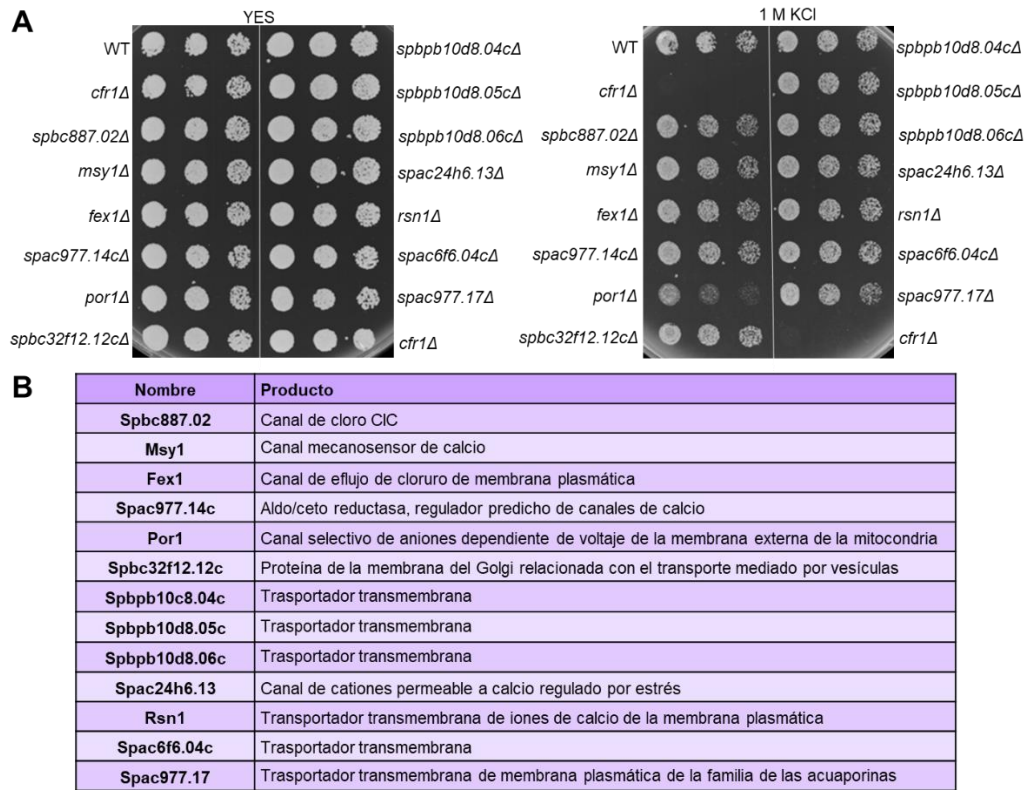
Para calcular los niveles de activación de CIP en una muestra, se cuantificó mediante ImageJ la intensidad de las bandas obtenidas por western blot para Pmk1 fosforilada (p42/44) y Pmk1 total (HA). Se calculó la proporción entre la intensidad de la banda de p42/44 y la de HA, y se representaron la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias en gráficos de barras debajo de las imágenes de los western blots en cada figura.

9. Bases de datos y programas bioinformáticos utilizados

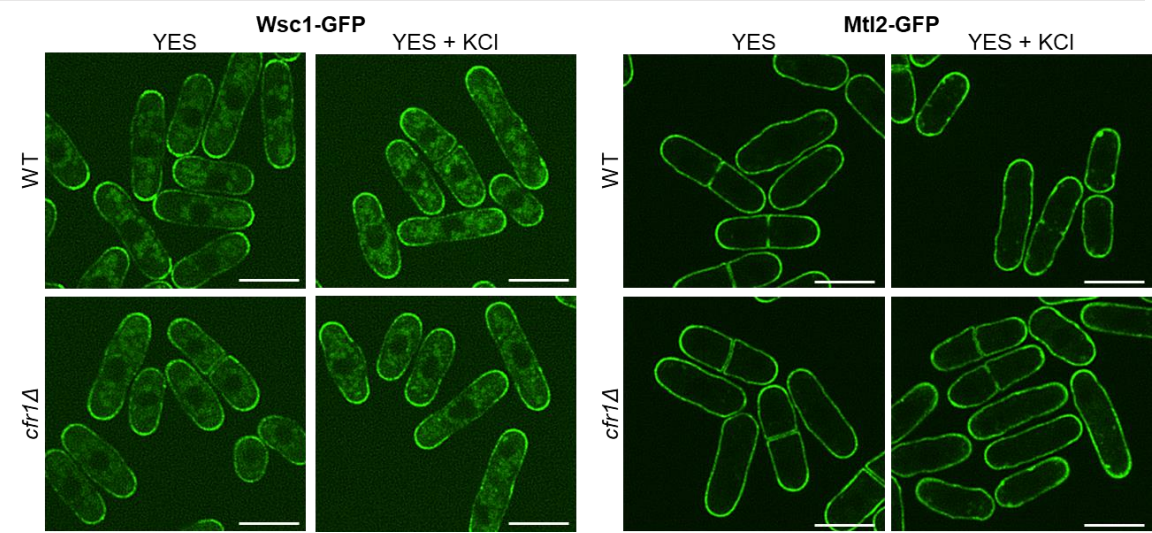
Para la obtención de las secuencias de los diferentes genes y proteínas, así como para el análisis informático de sus secuencias se utilizaron los siguientes programas y bases de datos: SGD (base de datos de *S. cerevisiae*), PomBase (base de datos de *S. pombe*), BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, programa de alineamiento de secuencias y búsqueda/comparación con las proteínas y genes depositados en las bases de datos) ClustalW (programa de alineamiento múltiple de secuencias de ADN y proteínas), ELM (Eukaryotic Linear Motif, programa de predicción de motivos en proteínas), Chromas (programa para la visualización de secuencias de ADN procedentes de secuenciación), ApE (programa para analizar secuencias de ADN y hacer mapas de restricción).

ANEXO

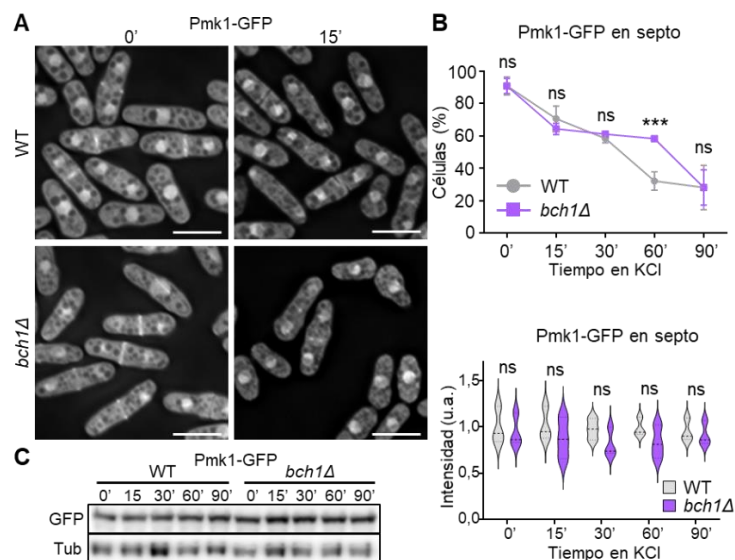
Anexo I. Figuras



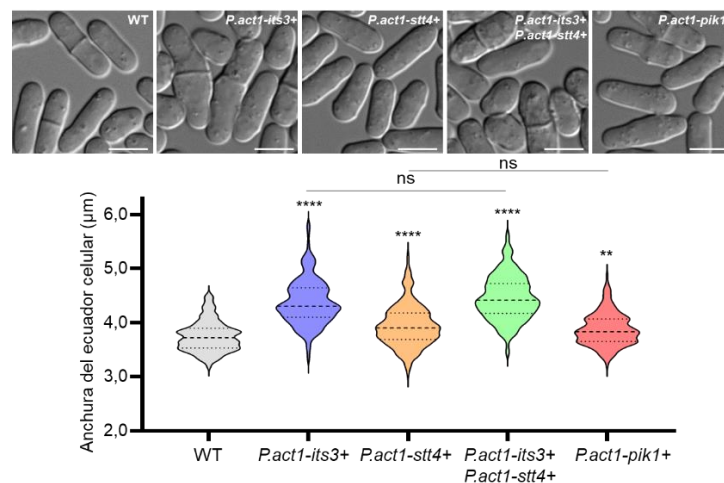
Anexo I-1. Crecimiento en KCl de mutantes nulos de genes anotados como transportadores o canales iónicos. (A) Las cepas indicadas se sembraron en YES y YES con KCl 1 M y se incubaron a 32°C durante 3 días. **(B)** Predicción de la proteína de los genes deletados en las cepas analizadas en (A), tal y como se indica en la PomBase (<https://www.pombase.org/>).



Anexo I-2. Localización de Wsc1 y Mlt2. Células de las cepas WT y *cfr1Δ* expresando Wsc1-GFP o Mlt2-GFP se incubaron en YES y YES con KCl 0,6 M durante 15 minutos y se fotografiaron en un microscopio confocal Dragonfly. Barra de escala, 10 μm.



Anexo I-3. Análisis de la localización de Pmk1 en ausencia del exómero. (A) Imágenes de células WT y *bch1Δ* que expresaban Pmk1-GFP y se incubaron en KCl 0,6 M durante el tiempo indicado (minutos). Las imágenes se capturaron en un sistema DeltaVision. **(B)** Panel superior, porcentaje de células con Pmk1-GFP en la zona del septo a los tiempos indicados de incubación con KCl 0,6 M. Panel inferior, intensidad de fluorescencia de Pmk1-GFP en la zona del septo en las células mencionadas (u.a., unidades arbitrarias). Los experimentos se realizaron por triplicado y los valores corresponden a la media, desviación estándar y significancia estadística de las diferencias, determinada por el test de comparaciones múltiples de Šidák (panel superior) y de Tukey (panel inferior). ns, no significativo; ***, $p < 0,001$. **(C)** Western blot de extractos celulares de las cepas WT y *bch1Δ* que expresaban Pmk1-GFP y que fueron tratadas con KCl 0,6 M durante los tiempos indicados (minutos). Las membranas se trataron con anticuerpos anti-GFP y anti-tubulina (Tub, control de carga). Barra de escala, 10 μ m.



Anexo I-4. Análisis del tamaño de las células de cepas que sobreexpresan diferentes genes. Imágenes de células de la cepa WT y de diferentes cepas que expresan los genes indicados bajo el control del promotor *act1+* (*P.act1*), incubadas en medio YES. Barra de escala, 10 μ m. El gráfico de violín representa la distribución de los datos obtenidos para la anchura del ecuador celular. Se muestran la media, la desviación estándar y la significancia estadística de las diferencias con respecto al control (WT), determinada mediante el test de comparaciones múltiples de Tukey. ns, no significativo; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$.

Anexo II. Tabla de cepas

ESTIRPE	GENOTIPO	PROCEDENCIA
HVP30	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP117	<i>leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP241	<i>cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP264	<i>cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP1443	<i>pmk1/spm1::LEU2 leu1-32 ura4Δ18 h-</i>	J.A. Cooper
HVP1733	<i>pmk1-HA6His::ura4+ ura4-Δ18 leu1-32 ade6 h+</i>	M. Gacto
HVP1734	<i>pmk1::ura4 pmk1-GFP:leu1+ h-</i>	M. Gacto
HVP2034	<i>leu1+ his3+ ura4+ ade6+ h-</i>	Colección HVM
HVP2092	<i>apm1::ura4 leu1-32 h-</i>	T. Kuno
HVP2356	<i>bch1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP2357	<i>bch1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP2871	<i>bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP3202	<i>pmk1-HA6His::ura4+ pmp1::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP3233	<i>pmk1-HA6His::ura4+ pmp1::KANMX6 cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP3348	<i>bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP3621	<i>mtl2-GFP:ura4+ leu1-32 his3-Δ1 ade6 h-</i>	Y. Sanchez
HVP3622	<i>wsc1-GFP:ura4 mtl2::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Y. Sanchez
HVP3642	<i>wsc1-GFP:ura4+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP3701	<i>apm3::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Bioneer
HVP3718	<i>pmk1-HA6His::ura4+ leu1-32 his3D1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP3797	<i>pmk1-HA6His::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Colección HVM
HVP3953	<i>HPHMX6 h- (hph.171k)</i>	I. Hagan/ YGRC
HVP3954	<i>gga21::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP3956	<i>gga22::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP3958	<i>tup11::ura4+ tup12::ura4+ cta3::ura4+ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	S. Whitehall
HVP3994	<i>gga21::KANMX6 gga22::KANMX6 his3-Δ1 h-</i>	Colección HVM
HVP3997	<i>its3-1 leu1-32 ura4-Δ18 h-</i>	P. Pérez
HVP4036	<i>its3-1 cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Colección HVM
HVP4068	<i>HPHMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h+</i>	Colección HVM
HVP4069	<i>cch1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Pérez
HVP4070	<i>ura4:pKK2+PCDRE-GFP his3-Δ1 h+</i>	D Hirata/P. Pérez
HVP4100	<i>ura4:pKK2+PCDRE-GFP cfr1::his3+ leu1? his3-Δ1 ura4? ade6? h?</i>	Colección HVM
HVP4106	<i>Pnda2::GFP-PH(GAP1):Tnda2::NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h+</i>	Colección HVM
HVP4174	<i>yam8::ura4+ leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Y. Sanchez
HVP4176	<i>yam8::ura4+ cfr1::his3 leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP4178	<i>cch1::KAN cfr1::his3 leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP4182	<i>ade6:mCherry-Psy1 nmt:cta3-YFP-Flag-6HIS</i>	T. Nakamura/YGRC
HVP4243	<i>Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Colección HVM
HVP4493	<i>Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2::NAT cfr1::his3+ leu1-32 his3?ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Colección HVM
HVP4509	<i>ent3::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Pérez
HVP4534	<i>Pnda2::GFP-PH(GAP1):Tnda2::NATMX6 cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6? h?</i>	Colección HVM
HVP4600	<i>mtl2-GFP:ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM

HVP4601	<i>wsc1-GFP:ura4+ cfr1::his3 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Colección HVM
HVP4729	<i>rgf1::his3+ rgf1-GFP:leu1+ his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Y. Sanchez
HVP4754	<i>rgf1::his3+ rgf1-GFP:leu1+ bch1::NATMX6 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Colección HVM
HVP4799	<i>pmk1-HA6His::ura4+ apm1::ura4+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h?</i>	Colección HVM
HVP4846	<i>trk2::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP4853	<i>pmr1::ura4+ leu1-32 h-</i>	J.C. Ribas
HVP4854	<i>trk2::ura4+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP4855	<i>tup11::ura4+ tup12::ura4+ cta3::ura4+ bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP4872	<i>cta3::ura4+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP4874	<i>cta3::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP4875	<i>pmr1::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18? ade6? h?</i>	Este trabajo
HVP4947	<i>pmk1::ura4 pmk1-GFP:leu1+ bch1::NATMX6 h-</i>	Colección HVM
HVP5131	<i>pkd2-GFP:KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5133	<i>pkd2-GFP:KAN cfr1::his3 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5161	<i>bch1::KAN leu1+ his3+ ura4+ ade6+ h-</i>	Este trabajo
HVP5172	<i>pck2-GFP:NATMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	P. Perez
HVP5173	<i>GFP-rho2:KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	P. Perez
HVP5174	<i>rho2::NATMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	P. Perez
HVP5175	<i>pck2::KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	P. Perez
HVP5176	<i>rgf1::NATMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	Y. Sanchez
HVP5177	<i>pek1::ura4+ his3D1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Y. Sanchez
HVP5181	<i>mkh1::ura4+ ura4-Δ18 ade6h+</i>	Y. Sanchez
HVP5190	<i>pmk1-HA6His::ura4+ gga21::KANMX6 gga22::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5196	<i>pck2-GFP:NATMX6 bch1::KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	Este trabajo
HVP5197	<i>GFP-rho2:KANMX6 bch1::KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 h+</i>	Este trabajo
HVP5208	<i>cta3-GFP:KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5209	<i>cta3-GFP:KAN bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5241	<i>nhx1::KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5249	<i>nhx1::KAN cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5362	<i>trk1::NAT trk2::ura4+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5364	<i>nhx1::KAN Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5365	<i>nhx1::KAN cfr1::his3+ Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ1 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5372	<i>trk1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5374	<i>trk1::NAT cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5376	<i>trk1::NAT trk2::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5377	<i>osr2::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Perez
HVP5378	<i>kha1::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Perez
HVP5380	<i>osr2::KAN cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5382	<i>kha1::KAN cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5387	<i>cta3-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FAPP1:Tnda2:NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5389	<i>cta3-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FAPP1:Tnda2:NAT bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5397	<i>pmc1::ura4+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6? h+</i>	J.C. Ribas

HVP5398	<i>pkd2-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5399	<i>pkd2-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5400	<i>cta3-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5401	<i>cta3-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FYVE:Tnda2:leu1+ bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5404	<i>pkd2-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FAPP1:Tnda2:NAT leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6? h-</i>	Este trabajo
HVP5405	<i>pkd2-GFP:KAN Pnda2:mCherry-FAPP1:Tnda2:NAT cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5425	<i>pmc1::ura4+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5426	<i>erg5::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Perez
HVP5427	<i>erg28::KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	P. Perez
HVP5432	<i>trp1322::ura4+ leu1-32 his3-Δ1 h+</i>	Q. Chen
HVP5433	<i>trp663::kanMX6 leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1 h?</i>	Q. Chen
HVP5434	<i>KanMX6-P81nmt1-pkd2 (pkd2-81KD) leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1 h-</i>	Q. Chen
HVP5436	<i>HPH:GFP-trk1 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5437	<i>HPH:GFP-trk1 cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5446	<i>erg5::KAN bch1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5447	<i>erg28::KAN bch1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5448	<i>trp663::kanMX6 bch1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1</i>	Este trabajo
HVP5449	<i>trp1322::ura4+ bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 h+ h+</i>	Este trabajo
HVP5453	<i>pkd2-81KD bch1::NAT leu1-32 ura4-Δ18 his3-Δ1 h-</i>	Este trabajo
HVP5506	<i>mkh1-GFP:KAN leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	J. Cansado
HVP5507	<i>pek1-GFP:KANMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	J. Cansado
HVP5508	<i>pmp1-GFP:KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	J. Cansado
HVP 5515	<i>mkh1-GFP:KANMX6 bch1:: NATMX6 leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5516	<i>pmp1-GFP:KANMX6 bch1::KANMX6 leu1-32 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5519	<i>its3-GFP:KAN leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5520	<i>its3-GFP:KAN cfr1::his3+ leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5533	<i>HPHMX6 Pcta3:pkd2-GFP:NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h+</i>	Este trabajo
HVP5534	<i>HPHMX6 Pcta3:pkd2-GFP:NATcfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h+</i>	Este trabajo
HVP5550	<i>cta3-GFP:KAN Pact1+:mCherry:D4H:Tact1 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5551	<i>cta3-GFP:KAN Pact1+:mCherry:D4H:Tact1 bch1::NAT leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h-</i>	Este trabajo
HVP5599	<i>pmk1-HA6His::ura4+ bch1::KANMX6 leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Este trabajo
HVP5600	<i>pmk1-HA6His::ura4+ HPHMX6:Pact1+:pek1DD:NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5601	<i>pmk1-HA6His::ura4+ HPHMX6:Pact1+:pek1DD:NATMX6 bch1::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5604	<i>HPHMX6:Pact1+:pek1DD:NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 h+</i>	Este trabajo
HVP5687	<i>HPHMX6:Pact1+:pek1DD:NATMX6 pck2-GFP:NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo
HVP5742	<i>HPHMX6:Pact1+:pek1DD:NATMX6 bch1::KANMX6 pck2-GFP:NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6? h?</i>	Este trabajo
HVP5754	<i>pmk1-HA6His::ura4+HPHMX6: Pact1+:its3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo

HVP5756	<i>pmk1-HA6His::ura4+HPHMX6: Pact1::its3+ cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5758	<i>pmk1-HA6His::ura4+ ppb1::NATMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5759	<i>pmk1-HA6His::ura4+ ppb1::NATMX6 cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5766	<i>rgf1::his3+ rgf1-GFP:leu1+ his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h+</i>	Y. Sanchez
HVP5786	<i>pmk1-HA6His::ura4+ ent3::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5787	<i>pmk1-HA6His::ura4+ ent3::KANMX6 cfr1::his3+ leu1-32 his3-Δ1 ura4-Δ18 ade6 h?</i>	Este trabajo
HVP5820	<i>pck2-GFP:NATMX6 gga21::KANMX6 gga22::KANMX6 leu1-32 his3? ura4-Δ18 ade6? h?</i>	Este trabajo
HVP5823	<i>apm1::ura4+ Pck2-GFP:NATMX6 leu1-32 his3? ura4-Δ18 h?</i>	Este trabajo
HVP5833	<i>GFP-GAP1:NATMX6 rho2::NATMX6 mCherry-rho2:leu1+ bch1::KANMX6 leu1-32 his3-Δ1? ura4-Δ18 ade6? h+</i>	Este trabajo

Anexo III. Secuencias utilizadas para construir cepas bajo la expresión de genes no nativos

P.cta3-pkd2-GFP-T.nmt1

ACCTTCGTAATACTTATTAGCGTAAGGAGGATCGGCATATGAAAATTGCAAAAGTATACGTAAACAATTAACACTGCAA
 ATGACTAAGCCTCAATCTTGGCAAACGTTTCAACGTTGAGTTGCCCTCTGGATTTCATTCTTGGTTAGTTTCTCTCAAA
 ATTTCTCGGTTTTTTGACATTTTTTTTCACTCTGAGTATTCTTCTCTCTGTCATGGAAATCCACACTTCTTCTTTAA
 CCGAATAATCTTAAATGCTAAATCGTCTCTCATCTTCGTTCCCTTGAATAACAACACTCCGCCATTTCGTCATTGTTACT
 CCGCTTGATAATGTCAGCTACTATGATTACGTAATTTATAGTTAAATTTCCCGAGGCAAGCTTTGCTGCTTATTGTATCT
 CTAGCCAATGTATGTTGAGGAAATCAATGTCGGAGTCATTGCAATCCGACACTCTGATATCGTTTTTCTTCAAGCCGTA
 TATATACTGCTGCTATTCTCTCACTTTTCTATATAAAAATTCTTTAACTAAAAAGTAGTAACTCGTCTTTTTTTTTGA
 ACATTTACTACCTGCTACCTGATCTGAGCTAAAGATCTGATAGCCCCTTGACGAAGATAACATTACGAGCTTCGGTTTAC
 CGTGTTAAGTAAATTAAGCTCCCTGATTATACTTTAATTATCACTATTTTCAAATTCTCTCGATCCCTCCATTTTAGT
 TTAACCTTTTTTTCCCTCTTCAAATTTCCCTTTTTCGTTAATACACCTTCTTGCGGTCTTTTCTTTTCCGTCCTGTGTTTAT
 TTGTTTATTTGCTTTCCACTTTTGTGTTTTGCTAGATCTCTGTATTTGGATTGCGTAGTACGCAATTAAGTGAGCTCG
 AGTTTAAATTTTAAATAATACGTTAATTTCCCAAAGGATCTCATTTGATCTGATCTGATCTGCTGTCCCTTGTGATCCT
 TGACTTTGCGTTTGGTTTTTAAAACCCACAGCACAATTTGGTATTTTCTTCTTTTACCTTTTCGATTCTAATTATTA
 TTTTATTACACTCCCTACGCCTCTATAATTTCTGTTTACTGAGCGTGCGTGTGAGAATATTTGTGTGTGACCTTGTTTACA
 TCATCTACACGATTTATTTACTAATTTGCTTCCAATCTTCTGCTATTTTGGTCAAGCATCGTTCATTAATTGTTTAT
 ATACATCTTTGAGCAATTTATTTTAAAACAAAAGTATTCCTCTAACTATTCCTATTTCTCTCTCTCACTACCGCTTT
 TTTACTTTTATATTAGACATAAACCTTTTCTTCTACATTTCTTTGGAAAACAAAACAGTTGCTTTTTTGATTTTACTT
 ATATTTCTCCCTTCTACTCATCCGATATATTCTTACTTCTTGATTCAATCTCAAATATTGTTCAATGATGAGGCTTTGG
 AGAAGCCCCTTTTACTCTTAGTTGTGGTGTGCGAGCTATTTTCATGGGCTGATGCTTTAACAGATTCAATTCGCCGA
 CTCTCTGTCCACATGTATGACTGATTCACAGTTATCAGCAAGTAAGCTCTATGCCTCGTATTTTCCGGACAATCAATCTGT
 TGCCTTTGATATCTCGATACAATCTTGTCTACGAATGTCAGTATAGACGTCGACATTAGTGCATACGGAATCGAAA
 TAAAGAAGGTGATAGATCCTTGCGATATGGAAATTTCTGGCTTCTGTCCAATGCAGACTGGAAATATTGCTTTATCTGG
 TAGTCATACTTTAACCGGAGAGGCTCTTTCTATTCTGATAGTATCCCTCCATTGCATACAGTTCCGGATTTAGATGC
 TGTTGTGACTATTAATATTTATGAATCAGATACAAACACACAATTAGCTTGTGTTCTGACTACAGTGCAAAATGGTCGTT
 CTGTTTACCACAGAGCTGTTTACTGGGTTATGTGTATGGTAATCGGTATCCCACTTTTAAATTTCTTACTGATATCCCTG
 TTCTTCAAACACCCGCACTTTGGGAAATCGTTGAAACGATGATTACCTTATTTAGTTTGTCTCAAATCCAGGCTTTGTATT
 CCATGATGGCTACTTCTTCTCTGCTATCATTTACAGTTGGGGCCGTAATTTATGTGGTTCGATGGGTATTATCAGGATT
 GGCTTCATGCAAGATGTTTTTACATGGTACGTTAAATCAACTGGCGGCACGCCATCTACTCTTGTAGATTGGGTATACA
 TGCTAATGTCGCCCTCGAAAACGTGGTATTGATTGGGCTCTCTCGCAAGCGTGCAACTACTACTGTCACTACTAGCA
 CAAGTGATTCTATTACCTGAGGGGAATCAAGCGTATTTATATATGATGGGGATTGAAACGACGAATTTCTTGTCTAC
 TGGGTTTTCTTTTTTATTATATTGTTGTTCTTTTCACTAGTTGCTATGGCTTCTAGATTATTGTTGAAATGGTGCTC
 CTTGCATCCAGAAATCAAGCTTTGAAAAAGCAACGTATCCGTCTTATTGGAAATCTATATCAAAGGATTTTCTATCG
 TGTGATTTTGTGCGATTCACTCAAATGAGTGTTTTGTCCATGTGGGAAATCTATACTCGTGATTCTTCGCTTTGGCATT
 TTTATCAATGTACGTGATTGTGGACATGGCAGTTTTGCTCTGCTATGCATTGTGCGGACAATCAAATTATCCGCAAAA
 CAGGACCTTATCCATCCTGACGTCTGTACAACCTATATTCTGACACTCAACACTGATGCGTTGGGGCTTTATGTAC
 GTGCAATTAGACGTCCGTTTCTTTTACTTTACTTTCCCACTGTTGCTTATAACCTTGGTACGCTCAATGTTTCATCGTTTTG
 GTCAGGGCTCACCAAAAGTCCAGGGCTGTGCCATGTTTGGTATTAGCGTTGTCGTTTTTGTCTTATGGTGATTCTCCGA
 CCTTATGCCACTAAACACATGAATACTTTGCATATCGGTGTTGCTTTAATGAATTTGATAAGTGTTTCTTTATTTTAGTG
 ATGTGTCAAGCTTTTTATGTGGAGGAATTAGCTCGTCAAGTTATTGGCATTATATTTTTTGATTGAACGCTATTACAAT
 GCTTCTTTTATCTCTGGGTATATTTATACGTACACTTATCGTCTGTTCCGTAAATCAGGACATGGTACTTATTACCGTAT
 CCTCGATGACCAAAAGCGAGAAGGCTACCTCGTATAACAAATCTATTAAGGATATGAGCTCTTCGACATGGCCTTCTCT
 GATCCGGCTTACTCTGGAACACTAGTTGAGAAGCTCCGTTGACCTTAATACACCAGAATATCCGTTTTCGAATCGTAATGA
 TTCAGACAGTACGTTACAAAATAACAAATATGTTTCCCTTGGGACGCTATCGAAGAAGCTTCGATGCCAACCTTCGTG
 GAAATACTGACGTGCAACAACCATTTATGGAATCAGATTATACCCGCATCTCTGAAAATAATAACAACGCTGAACGTGCG
 ACGCAAACCATTAACCAATGCTTTTCGTAGTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGTGAA
 TTAGATGGTGATGTTAATGGGCAAAAATTCTCTGTGAGGGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTA

[illegible]

En **rojo oscuro** se representa la región 5'-UTR del gen *cta3+*, que se usa como promotor. En **negro** se representa la ORF del gen *pkd2+*. En **verde** se representa la secuencia de la GFP. El fragmento de ADN con estas secuencias se clonó entre el promotor y el terminado de *nda2+* en el plásmido pINTH1

P.act1-pek1-S234D,T238D -T.nda2

AAAACCTTCTGCTGCTAAAGTGATCGAGTATTCCTGAATCTGGTGATGCAATGCAAGGACCGGGACCTGTTG
 GCATCACCTTGCTTTTATATTGCACTAATATGTCAATTTGTAGCTGTTGGAGGATTGCTCTATCACTATCGTAAAAAGTCA
 GCTTGCTCTTTAGTGTTGATCTACGATAATGAGACGGTGTTGGGTTGTTTTACTGAATTTTCTTTATTTTATGACAT
 CTTAATTTTATGTTAATGATTATCTTATACTTTTATCTATCTTTGATTAATACTAATATTCTTTGATCACTAATTA
 TTTTATAGTATACGATTCAACCCAACTATAATACATTGTATCAAGAGAAATTTTAATTAGATGTAATTAATAGCCATT
 TGATAAAAAAAAAATTACCTTTTTTTTCTAGTGTTAAATTATTGATCATAACAATGTGCAATGAATACTAATAAAATAG
 GGACACGCGAGTTGCAAACTTGAAATACCTTTGAAGATTGTCTGTGAATTTTGATAAGATTTTTATGACCATCTCTT
 TTATATTCGATATCGTGAACCTTCATTTTCTTTGTTTTTCTTTTCAAGTTAAATAACGCGGAAATTATTTTCTTATAT
 GTTTATAAGAGCTTTTAAAGGATTGCTATATCGCTTACAGTACTACAACCGGTTGCTCAATGTTATCCGTTTCCGCGGT
 CTTCTCCGTGCGCATTCTGCCGTGAAGTGCTAACGCTGTGTGTGGCTTTATCAAAAAAGTGCTCAAATATAGCAATTT
 CATACATATTTAAACACCCATTATACTTAAATGTATTTTTAAATATATAAGAGATTTTCACTGTATAACTGTGTATCTT
 ATCTATATGTAATCAACGGCTTCATACCACCTCAGCCAGCCGTGTTATAAATTACCGTTTACCAACTACATTTTTGTAA
 GAACCAAAAAACCTCAAAGACAAGACCAGTCCAAAAAACCTGTCTTGAACCTAGATACCAGTAATGGGTTCTCTGA
 AGAATATATAAGTCATCCTGAACGTAATGACAATCAAGGAATTGTGAGATTACAGACCTGGTGTTTCTAGCGAGTCG
 AAATTAACTCAGCGAAAGGAGAGCCGGGATAGTAAACATTTGTTCTTCTCTTCTGGAAGAACTTGATGATGATCACC
 TACATGAATTGGTTACAAATGGAGGTATTTGTACATGAACAGTCTAGGTGAAGGTGTTAGTGGCTCTGTAAGGAAAT
 GCAGAAATTCGTGGGACTCAGATGATTTTCGCTATGAAAAGTGTATTAGCTGTCCGAATACCGCTTTACAAAAGCAACT
 CCTTCGAGAGTTAAAAATCAACAGAAGTTGACCTCTCCTTACATCGTTAAATATTATGGCGCTTGCTACAATAACGCGAG
 AGTGTCAGTTAAACATAGCTATGGAATATTGCGGAGCAGGATCTCTGACGCGATATACAAACGtGTACGCAGTCAAG
 GTGGACGCACTGGAGAACGACCATTGGGCAAGATTGCATTGCGGTGTCCTTAGCGGTTTAAAGCTATTACATGACAGGA
 AAATAATACACCGTGATATTAAGCCATCAAATATCCTTCTGACGTCAAAAAGGTCAAGTGAAGTTATGCGATTTTGGTGT
 ATCTGGAGAATTGGTTAACGATCTCGCTGGCGATTTCACTGGAACCTCGTATTACATGGCGCCTGAACGAATTTCTGGG
 GGATCTTATACTATATCGTCAGATATATGGTCTTTGGGTTTAAACATTGATGGAGGTGCGATTAAACCGGTTTCCATTCCC
 TCCCAGGGTAGCCCCCACCATGCCTATTGAATTGCTCTCGTATATAATAAATATGCCACCTCCCTTTTACCTCAAG
 AACCCGGTATTAATGGTGCAAATCCTTTCAACATTTTCTATGCGTGTGTCTGGATAAAGACAAAACCTGCTGCTCTGGA
 CCCCCAAAATGCTTACCATCCTTGGGTAAAGCGTTGAGAGATTATGTGGACATGGAAGAGTTCCTTCGTCGTAAG
 TCTGGTCTGATTAG

En **rojo oscuro** se representa la región 5'-UTR del gen *act1+*, utilizada como promotor. En **negro** se representa el fragmento sintético de DNA (comprado a IDT) de la ORF de *pek1+* con las mutaciones S234D y T238D (subrayado en azul). Este fragmento incluye una mutación silenciosa para eliminar un sitio de restricción MluI (subrayado en naranja). El fragmento de ADN con estas secuencias se clonó entre el promotor y el terminado de *nda2+* en el plásmido pINTH1.

P.act1-its3+

GCTTATGGACTATTGCGAATAATGGAAGTGGGTTTCAGAAAGTTTTGGCTTGGTAAATTCGGGATTGCTCCTTTCCATA
 CAGAAAGCGATAATTTTATCCATTTACTGCCATTAGTGCGAATTATTGGAGAATGTGCCGGAACATTGGTGAAGTCCG
 GTGACTTTATATATCTAGGGAAGAACTGGTAGAAACAACACTTCGCTGGTATCAAGTGATCTGTTAGCTTGCCTCG
 TCCCCGCCGGGTACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAGAATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGG
 GCATGATGTGACTGTCGCCCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCG
 CACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGAAACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAA
 TTGTCCCGACGCCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAAGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCCTT
 TAAAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACAACC**ATG**GGTAAAAAGCCTGAAGTCAACGCG
 ACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGCGAAGAATCT
 CGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGGATATGCTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGAT
 CGTTATGTTTATCGGCACTTTGCATCGGCCGCGCTCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAATTACAGCGAGAGCC
 TGACCTATTGCATCTCCGCGGTGCACAGGGGTGCACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCGCTGTTCTGCA
 GCCGGTCGCGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCATTTCGACCCG
 AAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTTATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTATCACTGGCAAAGTGT
 GATGGACGACACCGTCAGTGCGTCCGTCGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGT
 CCGGCACCTCGTGACGCGGATTCGGCTCCAACAATGCTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCACTGACTG
 GAGCGAGGCGATGTTGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGGA
 GCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGACGATCGCCGCGGCTCCGGGCGTATATGCTCCGCA
 TTGGTCTTGACCACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTCGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACG
 CAATCGTCCGATCCGAGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGC
 TGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGA**TAAT**CAGTACTGAC
 AATAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATCAAATGTTA
 GCGTGATTTATATTTTTTTTCGCTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGAGAAAGTAATATCATGCGTC
 AATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGTCGATTCGATACTAACGCCGCCATCCA**GCATGCAAAACCTTCTCTGC**
CTGTAAGTGATCGAGTATCCCAAATCTTGGTGATGGAATCTAGCGAAGGACCGGGACCTTGTCATCACCTTGCTT
TTATATTGACTAATATGTCAATTTGTAGCTGTTGGAGGATTGCTCTATCACTATCGTAAAAGTCAGCTTGCTCTTTAGT
GTTTGATCTACGATAATGAGACGGTGTTTGGGTTGTTTTACTGAATTTTTCTTTATTTTATGACATCTTAATTTTTATGT
TAATGATTATCTTATACTTTTATCTATCTTTGATTAATACTAATATTCATTCTTTGATCACTAATATTTTTATAGTATAC
GATTCAACCCAACTATAATACATTGTATCAAGAGAAAATTTTAATTAGATGTAATTTAATAGCCATTTGATAAAAAA
TTACCTTTTTTTTGCTAGTGTTAAATTATTGATCATAACAATGTCGAATGAATACTAATAAAATAGGGACACGCGAGTT
GCAAATACTTGAAATACCTTTGAAGATTTGTCTGTGAATTTTGATAAGATTTTATGACCATCTCTTTTATATTGATATC
GTGAATTTTCATTTCTTTTGTGTTTTGCTTTTCAAGTTAAATAACGCGGAAATTATATTTCTTATATGTTTATAAGAGCT
TTAAAGGATTTGCTATATCGTTACAGTACTACAACCGTTGCTCAATGTTATCCGTTTCCGCGGTCTTCTCCGTGCGC
ATTCTGCCGTGAAGTGCTAACGCTGTGTGTGGCTTTATCAAAAAAGTGGCTCAAATATAGCAATTTATACATATTTAAA
CACCCATTATACTTAAATGTATATTTTAAATATATAAGAGATTTTCACTGTATAACTGTGTATCTTATCTATATGTAATC
AACGGCTTCATACACCTCAGCCAGCCGTGTTATAACTTACCGTTTACCAACTACATTTTTGTAAACGAACCAAAAAACC
CTCAAAAGACAAGACCGGGCCATG**AAAAATTGATTCAAACGGCATTAGTGAATCCGCATTCTATAACGAACGAAATCCC**
TTCGTATGATGAAAAGCAGGCTGTCGATTTGAATGGGAATGCTTTGCTCCAAATGGTACGTTTCAAAAAAGGATTTG
ATATCCCATAAAAACGATTTGGAACGTACGATGCGCCACGATGTTCTTCATACCAACCCCAAAATCGAAGTTCGGTCGG
AGAC

En **azul** se representa las secuencias de las regiones del gen *its3+* que se usaron para dirigir la integración de la construcción en su locus; corresponden a secuencias 5'-UTR y al inicio de la ORF de este gen. En **negro** se representa la secuencia del gen de resistencia a higromicina HPHMX6. En **rojo oscuro** se representa la región 5'-UTR del gen *act1+*, utilizada como promotor.

P.act1-stt4+

TTTTGTGATATTATTGGAGTTGTTTCGTGTTCTTCCATCTCTTTAGACGCAATATCATGAACATCTTCCATGTCTTTACCCA
 ATTCGAGTTTTTTGCGTTTTCCATTATCAATATTATTATCTTCTCAATATGGCGTTTTAAATATTATTTTTATCCTTATTT
 TCTGACATTTTTGAAGCTTTACCATCTATCGATAACTTCAGTTACTAAGTCGTATGGAAGTATCTTCCACAGATCTGTTTA
 GCTTGCCTCGTCCCCGCCGGTCACCCGGCCAGCGACATGGAGGCCAGAATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGC
 AGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTGCGCCGTACATTTAGCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTT
 TGATGGCCGCACGGCGGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCTCACAGA
 CGCGTTGAATTGTCCACGCCGCGCCCTGTAGAGAAATATAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCAT
 ATACTTCTTTTAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACAACC**ATG**GGTAAAAAGCCTGAA
 CTCACCGCAGCTGTGCGAGAAGTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGGAGGGC
 GAAGAATCTCGTGCTTTAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTC
 TACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCATTTGCATCGGCCGCGCTCCGATTCCGGAAGTCTTGACATTGGGGAATTCA
 GCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCGCGGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCCG
 CTGTTCTGCAGCCGGTGCAGGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCAT
 TCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGGCGTGATTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTACTCTG
 GCAAATGTGATGGACGACACCGTCAGTGCCTCGTGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTG
 CCCCAGTCCGGCACCTCGTGACGCGGATTTGGGCTCCAACAATGCTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGT
 CATTGACTGGAGCGAGGCGATGTTGGGGATTCCCAATACGAGGTCGCCAACATCTTCTTCTGGAGGCGTGTTGGC
 TTGTATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAAGATCGCCGCGGCTCCGGCGTATA
 TGCTCCGATTGGTCTTGACCACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTGC
 ATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTGCGGCGTACACAAATCGCCGCGAGAAGCGCGGCGTCTGGA
 CCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAGTGGAACCGACGCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAA**TAAT**CA
 GTACTGACAATAAAAAAGATTCTTGTTTCAAGAACTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAATC
 AAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTGCCTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCAGCAAGTAATAT
 CATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTGCCTATACTGCTGTCGATTGATACTAACGCCGCCATCCAGCATGC**AAAA**C
CTTCTCTGCCTGTAAGTGATCGAGTATCCCAAATCTTGGTGCATGGAATCCTAGCGAAGGACCGGGACCTTGTCATC
ACCTTGCTTTTATATTGACTAATATGTCAATTTGAGCTGTTGGAGGATTGCTCTATCACTATCGTAAAGTCAGCTTGC
TCTTAGTGTTGATCTACGATAATGAGACGGTGTTGGGTTGTTTTACTGAATTTTTCTTTATTTTATGACATCTTAAT
TTTTATGTTAATGATTATTCTTATACTTTATCTATCTTTGATTAATAAATATTTCATTCTTTGATCACTAATTATTTTTAT
AGTATACGATTCAACCACTATAATACATTGTATCAAGAGAAATTTTAATTAGATGTAATTAATAGCCATTTGATAA
AAAAAATTACCTTTTTTTTTGCTAGTGTTAAATTATTGATCATAACAATGTGAATGAATACTAATAAAATAGGGACAC
GCGAGTTGCAAACTTGAAATACCTTTGAAGATTTGTCTGTGAATTTTGATAAGATTTTTATGACCATCTCTTTATATT
CGATATCGTGAATTTTATTTTCTTTTGTCTTTTCAAGTTAAATAACGCGGAAATTATTTTCTTATATGTTTAT
AAGAGCTTTTAAAGATTTGCTATATCGCTTACAGTACTACAACCGTTGCTCAATGTTATCCGTTTCCGCGGTCTTCTTC
CGTGCGATTCTGCCGTGAAGTGCTAACGCTGTGTGTGGCTTTATCAAAAAAGTGGCTCAAATATAGCAATTTATACA
TATTTAAACACCCATTATACTTAAATGTATATTTTAAATATATAAGAGATTTTCACTGTATAACTGTGTATCTTATCTATA
TGTAATCAACGGCTTCATACCACTCAGCCAGCCGTGTTATAACTTACCGTTTACCACTACATTTTTGTAAACGAACCAA
AAAACCTCAAAAGACAAGACCGGGCCCACTAAGTATG**GATTGGTAAGTGTTTATTTTTCCCTTTCGAATGCACA**

GTCTACTAATTATTATTAGCATCGATAAATCAATCAGAAGGGAATCTTTACGAAAATTTGGCTGCCTTCCGATCACGGT
TGGAATCTGTTTCGTACAATCAAGTAATCGTTACTCAAAATTTGCTTGAAGCAGATTCTAAGCTATTTAAGGCCAAAGAA
TTGAGGACACTGTCTGTCAATTTGTGAAGTACTTTGGAAAACAAAGCCTCTGAAAATGCCTTGACTTTGTTCCAACAG
CTTCGCTTTTACTTGCTGAATTATCTATTTTGAAGATACCTCGGAGTACTCGA

En **azul** se representa las secuencias de las regiones del gen *stt4+* que se usaron para dirigir la integración de la construcción en su locus; corresponden a secuencias 5'-UTR y al inicio de la ORF de este gen. En **negro** se representa la secuencia del gen de resistencia a higromicina HPHMX6. En **rojo oscuro** se representa la región 5'-UTR del gen *act1+*, utilizada como promotor.

P.act1-pik1+

CGCTGTAAGCGGAAAGTGATTTATAGGTCTCTAGGAACTGTCCTTTTCTGAATTTTAGATAGATTAATTGATGTAGCAT
TCTTTTTCGTTGCAAGTGATAGTAAAGCTTTGATTGTCAATTAACAGTCTGTTTTAGTATTATTAATACTACATAATTAA
TATTGAGCTCTACTGAGAATTTATTTAGTAATATTTGGAATTGTAACAAAAATTCAATTTTTGCAACTGGCATGTTTACAT
TTTGAGATGATGACCTACCTCCCTTTTAGTGGATACCTGGCCTGATCTGTTAGCTTGCCTCGTCCCGCCGGGTAC
CCGGCCAGCGACATGGAGGCCAGAATACCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGT
CGCCCGTACATTTAGCCCATACATCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCAAGCAA
AAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGC
GCCCCTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTCATATACTTCTTTTAAAATCTTGCTAG
GATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACCAACC**ATG**GGTAAAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTGAGAA
GTTTCTGATCGAAAAGTTGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTC
GATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGATGGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGG
CACTTTGCATCGGCCGCGCTCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGAATTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCT
CCCGCCGTGCACAGGGTGTACGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCCGCTGTTCTGCAGCCGGTGCAGGAGG
CCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCATTCCGACCGCAAGGAATCGGTCAAT
ACACTACATGGCGTGATTTTATATGCGCGATTGCTGATCCCATGTGTATCACTGGCAAATGTGATGGACGACACCGT
CAGTGCGTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGGCCGAGGACTGCCCGAAGTCCGGCACCTCGTGCA
CGCGGATTCGGCTCCAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCATTGACTGGAGCGAGGCGATGTT
CGGGGATTCCTAATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTGAGGGCGTGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTA
CTTCGAGCGGAGGCATCCGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGCGTATATGCTCCGATTGGTCTTGACCAACT
CTATCAGAGCTTGTTGACGGCAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGG
AGCCGGGACTGTCGGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGTCTGGACCGATGGCTGTGTAGAAGTACTCG
CCGATAGTGGAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAGGAA**TAA**TCAGTACTGACAATAAAAAAGATTCTTGT
TTTCAAGAACTTGCTATTTGTATAGTTTTTTATATTGTAGTTGTTCTATTTTAAATCAAATGTTAGCGTGATTTATTTTTT
TTCGCTCGACATCATCTGCCAGATGCGAAGTTAAGTGCGCAGAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCT
GGTGCCTATACTGCTGTCGATTGATACTAACGCCGCCATCCAGCATGCGCATGC**AAAACCTTCTCTGCCTGTAAGTGAT**
CGAGTATCCCAAATCTTGGTGCATGGAATCTAGCGAAGGACCGGGACCTTGTGCATCACCTTGCTTTTATATTGCACT
AATATGTCAATTTGTAGCTGTTGGAGGATTGCTCTATCACTATCGTAAAAGTCAGCTTGCTCTTTAGTGTTTGATCTACG
ATAATGAGACGGTGTTTGGGTTGTTTTACTGAATTTTTCTTTATTTTATGACATCTTAATTTTTATGTTAATGATTATTC
TTATACTTTTATCTATCTTTGATTAAACTAATATTCATTCTTTGATCACTAATTATTTTTATAGTATACGATTCAACCCAA
CTATAATACATTGTATCAAGAGAAATTTTAATTAGATGTAATTTAATAGCCATTTGATAAAAAAAATTACCTTTTTTTT
TGCTAGTGTTAAATTATTGATCATAACAATGTCGAATGAATACTAATAAAATAGGGACACGCGAGTTGCAAATACTTGA
AATACCTTTGAAGATTTGTCTGTGAATTTGATAAGATTTTTATGACCATCTCTTTTATATTGATATCGTGAACCTTCATT
TTCTTTTGTTTTTGCTTTTCAAGTTAAATAACGCGGAAATTATATTTCTTATATGTTTATAAGAGCTTTTAAAGGATTTG
CTATATCGCTTACAGTACTACAACCGGTTGCTCAATGTTATCCGTTTCCGCGGTCTTCTCCGTGCGCATTCTGCCGTGAA
GTGCTAACGCTGTGTGTGGCTTTATCAAAAAAGTGGCTCAAATATAGCAATTTATACATATTTAAACACCCATTATACT
TAAATGTATATTTTAAATATATAAGAGATTTTCACTGTATAACTGTGTATCTTATCTATATGAATCAACGGCTTCATAC
CACCTCAGCCAGCCGTGTTATAACTTACCGTTTACCAACTACATTTTTGTAAACGAACCAAAAAACCTCAAAAGACAAG
ACCACTAGTATG**GGCGGCCGCCATCTTCAATTGCGGAAATGTATGACTTTTGATCGTTGTGTAGCTGCGTAATTA**
CGCTATTTCTAGGAGTTACTTTTAAGATTCTTTGAGTCTGCCATTTACAGAGTCAACTTTGTGTTGCATATCTTTCACGC
TATCCTAACAAATATTGGCATTATCACTTTCTTTCGAAAACTAGCAACGTATGTCTACCGTATCATTCTTTGTTTTTA
TGTCTAACACATATTAGATTTCTTATGAAGAGATAGAATTTTTATTCCTCAATTAATGTACGTTTATTTGATAAATAA
AGAAAAATTTTGGGGGAAGGAAAGTACAAAAAGTCGAGCTCATAAGTCAGTGAAAGCCGAGTATATGACTCATAT
GCCTATTTTATAATTAATGACTCTTACCTTTGATTTCTTCTTCAACGTTTATTCGTTGTGTTGTCGTCATCTCTA
ATATCATACTGTAGTCATCTCGTCCTTAACAAAGATTCTGAAAGCGTTGC

En **azul** se representa las secuencias de las regiones del gen *pik1+* que se usaron para dirigir la integración de la construcción en su locus; corresponden a secuencias 5'-UTR y al inicio de la ORF de este gen. En **negro** se representa la secuencia del gen de resistencia a higromicina HPHMX6. En **rojo oscuro** se representa la región 5'-UTR del gen *act1+*, utilizada como promotor.

BIBLIOGRAFÍA

- Abubakar, Y., Zheng, W., Olsson, S., & Zhou, J. (2017). Updated Insight into the Physiological and Pathological Roles of the Retromer Complex. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1601. <https://doi.org/10.3390/ijms18081601>
- Alder-Baerens, N., Lisman, Q., Luong, L., Pomorski, T., & Holthuis, J. C. M. (2006). Loss of P4 ATPases Drs2p and Dnf3p Disrupts Aminophospholipid Transport and Asymmetry in Yeast Post-Golgi Secretory Vesicles □ D. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1632–1642. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-10>
- Anitei, M., & Hoflack, B. (2011). Exit from the trans-Golgi network: From molecules to mechanisms. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 23, Issue 4, pp. 443–451). <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.03.013>
- Anton, C., Taubas, J. V., & Roncero, C. (2018). The functional specialization of exomer as a cargo adaptor during the evolution of fungi. *Genetics*, 208(4), 1483–1498. <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300767>
- Anton, C., Zanolari, B., Arcones, I., Wang, C., Mulet, J. M., Spang, A., & Roncero, C. (2017). Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Molecular Biology of the Cell*, 28(25), 3672–3685. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-09-0549>
- Anton-Plagaro, C., Sanchez, N., Valle, R., Mulet, J. M., Duncan, M. C., & Roncero, C. (2021). Exomer complex regulates protein traffic at the TGN through differential interactions with cargos and clathrin adaptor complexes. *FASEB Journal*, 35(6). <https://doi.org/10.1096/fj.202002610R>
- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M. A., Durán, A., & Henar Valdivieso, M. (2000). Proper ascospore maturation requires the *chs1* + chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular Microbiology*, 35(1), 79–89. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01678.x>
- Arellano M, Durán A, & Pérez P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J*, 15(17), 4584–4591.
- Arellano, M., Duran, A., & Perez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science*, 110(20), 2547–2555. <https://doi.org/10.1242/jcs.110.20.2547>
- Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Duran, A., & Perez, P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *Journal of Cell Science*, 112(20), 3569–3578. <https://doi.org/10.1242/jcs.112.20.3569>
- Ariño, J., Aydar, E., Drulhe, S., Ganser, D., Jorrín, J., Kahm, M., Krause, F., Petrezsélyová, S., Yenush, L., Zimmermannová, O., Van Heusden, G. P. H., Kschischo, M., Ludwig, J., Palmer, C., Ramos, J., & Sychrová, H. (2014). Systems Biology of Monovalent Cation Homeostasis in Yeast. The Translucent Contribution. In *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 64, pp. 1–63). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800143-1.00001-4>

- Ariño, J., Ramos, J., & Sychrova, H. (2019). Monovalent cation transporters at the plasma membrane in yeasts. *Yeast*, 36(4), 177–193. <https://doi.org/10.1002/yea.3355>
- Audhya, A., & Emr, S. D. (2002). Stt4 PI 4-Kinase Localizes to the Plasma Membrane and Functions in the Pkc1-Mediated MAP Kinase Cascade. *Developmental Cell*, 2(5), 593–605. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00168-5)
- Aydar, E., & Palmer, C. P. (2009). Polycystic kidney disease channel and synaptotagmin homologues play roles in schizosaccharomyces pombe cell wall synthesis/Repair and membrane protein trafficking. *Journal of Membrane Biology*, 229(3), 141–152. <https://doi.org/10.1007/s00232-009-9180-6>
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P., & Pringle, J. R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast*, 14(10), 943–951. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<943::AID-YEA292>3.0.CO;2-Y)
- Balcells, L., Calero, F., Gómez, N., Ramos, J., & Ariño, J. (1999). The *Schizosaccharomyces pombe* Pzh1 protein phosphatase regulates Na⁺ ion influx in a Trk1-independent fashion. *European Journal of Biochemistry*, 260(1), 31–37. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00129.x>
- Balcells, L., Gómez, N., Casamayor, A., Clotet, J., & Ariño, J. (1997). Regulation of Salt Tolerance in Fission Yeast by a Protein-Phosphatase-Z-Like Ser/Thr Protein Phosphatase. *European Journal of Biochemistry*, 250(2), 476–483. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.0476a.x>
- Balla, T., Gulyas, G., Mandal, A., Alvarez-Prats, A., Niu, Y., Kim, Y. J., & Pemberton, J. (2023). Roles of Phosphatidylinositol 4-Phosphorylation in Non-vesicular Cholesterol Trafficking. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1422, pp. 327–352). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-031-21547-6_12
- Bankaitis, V. A., Garcia-Mata, R., & Mousley, C. J. (2012). Golgi membrane dynamics and lipid metabolism. In *Current Biology* (Vol. 22, Issue 10). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.004>
- Banuelos, M. G., Moreno, D. E., Olson, D. K., Nguyen, Q., Ricarte, F., Aguilera-Sandoval, C. R., & Gharakhanian, E. (2010). Genomic analysis of severe hypersensitivity to hygromycin B reveals linkage to vacuolar defects and new vacuolar gene functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 56(2), 121–137. <https://doi.org/10.1007/s00294-009-0285-3>
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cellular Signalling*, 20(4), 748–757. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.12.017>
- Barfield, R. M., Fromme, J. C., & Schekman, R. (2009). The Exomer Coat Complex Transports Fus1p to the Plasma Membrane via a Novel Plasma Membrane Sorting Signal in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 4985–4996. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2), 383–410. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.142810>

- Bassett, D. E., Boguski, M. S., & Hieter, P. (1996). Yeast genes and human disease. *Nature*, 379(6566), 589–590. <https://doi.org/10.1038/379589a0>
- Bateman, A., & Chothia, C. (1996). Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Current Biology*, 6(12), 1544–1547. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)70765-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)70765-3)
- Batrouni, A. G., & Baskin, J. M. (2021). The chemistry and biology of phosphatidylinositol 4-phosphate at the plasma membrane. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116190>
- Behnia, R., & Munro, S. (2005). Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature*, 438(7068), 597–604. <https://doi.org/10.1038/nature04397>
- Benito, B., Garcíadeblás, B., & Rodríguez-Navarro, A. (2002). Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi The GenBank accession numbers for the sequences reported in this paper are: *Pleurotus ostreatus* ENA1, AJ420741; *Phycomyces blakesleeanus* ENA1, AJ420742; *Ph. blakesleeanus* PCA1, AJ420743; *Blakeslea trispora* ENA1, AJ420744; *B. trispora* BCA1, AJ420745; *B. trispora* BCA2, AJ420746. *Microbiology*, 148(4), 933–941. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-933>
- Bigay, J., & Antonny, B. (2012). Curvature, Lipid Packing, and Electrostatics of Membrane Organelles: Defining Cellular Territories in Determining Specificity. In *Developmental Cell* (Vol. 23, Issue 5, pp. 886–895). <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.10.009>
- Bihler aY, H., Slayman, ord L., Bertl, A., Bihler, H., Slayman, C., Bertl, A., Lett, F., Roberts, S., Fischer, M., Dixon, G., & Bacteriol, J. (n.d.). *Low-αnity potassium uptake by Saccharomyces cerevisiae is mediated by NSC1, a calcium-blocked non-specific cation channel*. www.bba-direct.com
- Bilodeau, P. S., Winistorfer, S. C., Allaman, M. M., Surendhran, K., Kearney, W. R., Robertson, A. D., & Piper, R. C. (2004). The GAT Domains of Clathrin-associated GGA Proteins Have Two Ubiquitin Binding Motifs. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54808–54816. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406654200>
- Black, M. W., & Pelham, H. R. B. (2000). A Selective Transport Route from Golgi to Late Endosomes That Requires the Yeast Gga Proteins. *The Journal of Cell Biology*, 151(3), 587–600. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.587>
- Blagoveshchenskaya, A., Fei, Y. C., Rohde, H. M., Glover, G., Knödler, A., Nicolson, T., Boehmelt, G., & Mayinger, P. (2008). Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *Journal of Cell Biology*, 180(4), 803–812. <https://doi.org/10.1083/jcb.200708109>
- Blatch, G. L., & Lässle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays*, 21(11), 932–939. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-1878\(199911\)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-1878(199911)21:11<932::AID-BIES5>3.0.CO;2-N)
- Boehm, M., & Bonifacino, J. S. (2001). Adaptins. *Molecular Biology of the Cell*, 12(10), 2907–2920. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.10.2907>

- Bonangelino, C. J., Nau, J. J., Duex, J. E., Brinkman, M., Wurmser, A. E., Gary, J. D., Emr, S. D., & Weisman, L. S. (2002). Osmotic stress-induced increase of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate requires Vac14p, an activator of the lipid kinase Fab1p. *Journal of Cell Biology*, 156(6), 1015–1028. <https://doi.org/10.1083/jcb.200201002>
- Bonifacino, J. S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. In *Journal of Cell Biology* (Vol. 204, Issue 1, pp. 7–17). <https://doi.org/10.1083/jcb.201310021>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). Review The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion ganelles of the pathway. Such observations inspired the vesicular transport hypothesis, which states that the transfer of cargo molecules between organelles of the. In *Cell* (Vol. 116).
- Bonifacino, J. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4(5), 409–414. <https://doi.org/10.1038/nrm1099>
- Bossi, E., Centinaio, E., Castagna, M., Giovannardi, S., Vincenti, S., Sacchi, V. F., & Peres, A. (1999). Ion binding and permeation through the lepidopteran amino acid transporter KAAT1 expressed in *Xenopus* oocytes. *The Journal of Physiology*, 515(3), 729–742. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1999.729ab.x>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. In *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* (Vol. 72).
- Brett, C. L., Tukaye, D. N., Mukherjee, S., & Rao, R. (2005). The Yeast Endosomal Na⁺(K⁺)/H Exchanger Nhx1 Regulates Cellular pH to Control Vesicle Trafficking. *Molecular Biology of the Cell*, 16, 1396–1405. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04>
- Brown, P. D., & Sepulveda, F. V. (1985). POTASSIUM MOVEMENTS ASSOCIATED WITH AMINO ACID AND SUGAR TRANSPORT IN ENTEROCYTES ISOLATED FROM RABBIT JEJUNUM. In *J. Physiol* (Vol. 363).
- Buser, D. P., Bader, G., & Spiess, M. (2022). Retrograde transport of CDMPR depends on several machineries as analyzed by sulfatable nanobodies. *Life Science Alliance*, 5(7). <https://doi.org/10.26508/lsa.202101269>
- Buser, D. P., Schleicher, K. D., Prescianotto-Baschong, C., & Spiess, M. (2018). A versatile nanobody-based toolkit to analyze retrograde transport from the cell surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(27), E6227–E6236. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801865115>
- Buser, D. P., & Spang, A. (2023). Protein sorting from endosomes to the TGN. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1140605>
- Caillaud, M. C. (2019). Anionic lipids: A pipeline connecting key players of plant cell division. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00419>

- Calero, F., Montiel, V., Caracuel, Z., Cabello-Hurtado, F., & Ramos, J. (2004). On the role of Trk1 and Trk2 in *Schizosaccharomyces pombe* under different ion stress conditions. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 619–624. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.11.003>
- Calero, F., & Ramos, J. (2003). K⁺ fluxes in *Schizosaccharomyces pombe*. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 4, Issue 1, pp. 1–6). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00111-9)
- Calero, F., Stor Go´mez, N. ´E., Go´mez, G., Joaquí, J., Arin˜o, J., Arin˜o, A., & Ramos, J. (2000). Trk1 and Trk2 Define the Major K Transport System in Fission Yeast. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 182, Issue 2).
- Calonge, T. M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I., & Perez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Rho2p GTPase Regulates Cell Wall α -Glucan Biosynthesis through the Protein Kinase Pck2p. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4393–4401. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4393>
- Canagarajah, B. J., Ren, X., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2013). *The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery*. <https://doi.org/10.1002/pro.02235>
- Cancino, J., Jung, J. E., & Luini, A. (2013). Regulation of Golgi signaling and trafficking by the KDEL receptor. In *Histochemistry and Cell Biology* (Vol. 140, Issue 4, pp. 395–405). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1130-9>
- Cancino, J., & Luini, A. (2013). Signaling Circuits on the Golgi Complex. In *Traffic* (Vol. 14, Issue 2, pp. 121–134). <https://doi.org/10.1111/tra.12022>
- Cansado, J. (2018). To finish things well: cysteine methylation ensures selective GTPase membrane localization and signalling. *Current Genetics*, 64(2), 341–344. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0756-x>
- Cansado, J., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., & Madrid, M. (2022). The Fission Yeast Cell Integrity Pathway: A Functional Hub for Cell Survival upon Stress and Beyond. *Journal of Fungi*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/jof8010032>
- Cansado, J., Soto, T., Gacto, M., & Pérez, P. (2010). Rga4, a Rho-GAP from fission yeast. *Communicative & Integrative Biology*, 3(5), 436–439. <https://doi.org/10.4161/cib.3.5.12284>
- Capera, J., Serrano-Novillo, C., Navarro-Pérez, M., Cassinelli, S., & Felipe, A. (2019). The potassium channel odyssey: Mechanisms of traffic and membrane arrangement. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20030734>
- Carman, G. M., & Han, G. S. (2011). Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 859–883. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060409-092229>
- Cartagena-Lirola, H., Durán, Á., & Valdivieso, M. -Henar. (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* *cfr1*⁺ gene participates in mating through a new pathway that is independent of *fus1*⁺. *Yeast*, 23(5), 375–388. <https://doi.org/10.1002/yea.1361>

- Casado, C., Yenush, L., Melero, C., Ruiz, M. del C., Serrano, R., Pérez-Valle, J., Ariño, J., & Ramos, J. (2010). Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Letters*, 584(11), 2415–2420. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.04.042>
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Science*, 263(5148), 802–805. <https://doi.org/10.1126/science.8303295>
- Chatfield-Reed, K., Vachon, L., Kwon, E.-J. G., & Chua, G. (2016). Conserved and Diverged Functions of the Calcineurin-Activated Prz1 Transcription Factor in Fission Yeast. *Genetics*, 202(4), 1365–1375. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.184218>
- Chen, C., Rodriguez Pino, M., Haller, P. R., & Verde, F. (2019). Conserved NDR/LATS kinase controls RAS GTPase activity to regulate cell growth and chronological lifespan. *Molecular Biology of the Cell*, 30(20), 2598–2616. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-03-0172>
- Cheng, H., Sugiura, R., Wu, W., Fujita, M., Lu, Y., Sio, S. O., Kawai, R., Takegawa, K., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2002). Role of the Rab GTP-Binding Protein Ypt3 in the Fission Yeast Exocytic Pathway and Its Connection to Calcineurin Function. *Molecular Biology of the Cell*, 13(8), 2963–2976. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-09-0463>
- Cherfils, J., & Zeghouf, M. (2013). Regulation of Small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *Physiol Rev*, 93, 269–309. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2012.-Small>
- Chidambaram, S., Müllers, N., Wiederhold, K., Haucke, V., & von Mollard, G. F. (2004). Specific Interaction between SNAREs and Epsin N-terminal Homology (ENTH) Domains of Epsin-related Proteins in trans-Golgi Network to Endosome Transport. *Journal of Biological Chemistry*, 279(6), 4175–4179. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308667200>
- Cohen, A., Kupiec, M., & Weisman, R. (2014). Glucose Activates TORC2-Gad8 Protein via Positive Regulation of the cAMP/cAMP-dependent Protein Kinase A (PKA) Pathway and Negative Regulation of the Pmk1 Protein-Mitogen-activated Protein Kinase Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 289(31), 21727–21737. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.573824>
- Collins, B. M., McCoy, A. J., Kent, H. M., Evans, P. R., & Owen, D. J. (2002). Molecular Architecture and Functional Model of the Endocytic AP2 Complex. *Cell*, 109(4), 523–535. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00735-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00735-3)
- Čopič, A., Starr, T. L., & Schekman, R. (2007). Ent3p and Ent5p Exhibit Cargo-specific Functions in Trafficking Proteins between the *Trans*-Golgi Network and the Endosomes in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 18(5), 1803–1815. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-11-1000>
- Corbett, E. F., & Michalak, M. (2000). Calcium, a signaling molecule in the endoplasmic reticulum? *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 307–311. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01588-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01588-7)

- Cortés, J. C. G., Katoh-Fukui, R., Moto, K., Ribas, J. C., & Ishiguro, J. (2004). Schizosaccharomyces pombe Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. *Eukaryotic Cell*, 3(5), 1124–1135. <https://doi.org/10.1128/EC.3.5.1124-1135.2004>
- Costaguta, G., Duncan, M. C., Fernández, G. E., Huang, G. H., & Payne, G. S. (2006). Distinct Roles for TGN/Endosome Epsin-like Adaptors Ent3p and Ent5p □ D. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 3907–3920. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Costaguta, G., Stefan, † C J, Bensen, E. S., Emr, § S D, & Payne, G. S. (2001). Yeast Gga Coat Proteins Function with Clathrin in Golgi to Endosome Transport. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).
- Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., & Sanchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen*, 2(5), 778–794. <https://doi.org/10.1002/mbo3.113>
- Curto, M. Á., Sharifmoghadam, M. R., Calpena, E., De León, N., Hoya, M., Doncel, C., Leatherwood, J., & Valdivieso, M. H. (2014). Membrane organization and cell fusion during mating in fission yeast requires multipass membrane protein Prm1. *Genetics*, 196(4), 1059–1076. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.159558>
- Daboussi, L., Costaguta, G., Ghukasyan, R., & Payne, G. S. (2017). Conserved role for Gga proteins in phosphatidylinositol 4-kinase localization to the trans -Golgi network. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(13), 3433–3438. <https://doi.org/10.1073/pnas.1615163114>
- Daboussi, L., Costaguta, G., & Payne, G. S. (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nature Cell Biology*, 14(3), 239–248. <https://doi.org/10.1038/ncb2427>
- Dacks, J. B., & Robinson, M. S. (2017). Outerwear through the ages: evolutionary cell biology of vesicle coats. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 47, pp. 108–116). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.04.001>
- Dart, C. (2010). Lipid microdomains and the regulation of ion channel function. *Journal of Physiology*, 588(17), 3169–3178. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.191585>
- Day, K. J., Casler, J. C., & Glick, B. S. (2018). Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System. *Developmental Cell*, 44(1), 56-72.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.12.014>
- De Craene, J.-O., Bertazzi, D., Bär, S., & Friant, S. (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3), 634. <https://doi.org/10.3390/ijms18030634>
- de León, N., Hoya, M., Curto, M. -Angeles, Moro, S., Yanguas, F., Doncel, C., & Valdivieso, M. -Henar. (2016). The AP-2 complex is required for proper temporal and spatial dynamics of endocytic patches in fission yeast. *Molecular Microbiology*, 100(3), 409–424. <https://doi.org/10.1111/mmi.13327>

- De, M., Abazeed, M. E., & Fuller, R. S. (2013). Direct binding of the Kex2p cytosolic tail to the VHS domain of yeast Gga2p facilitates TGN to prevacuolar compartment transport and is regulated by phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, 24(4), 495–509. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-11-0843>
- De Matteis, M. A., Di Campli, A., & Godi, A. (2005). The role of the phosphoinositides at the Golgi complex. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1744, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 396–405). <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2005.04.013>
- De Matteis, M. A., & Luini, A. (2008). Exiting the Golgi complex. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 4, pp. 273–284). <https://doi.org/10.1038/nrm2378>
- De Matteis, M. A., Wilson, C., & D'Angelo, G. (2013). Phosphatidylinositol-4-phosphate: The Golgi and beyond. *BioEssays*, 35(7), 612–622. <https://doi.org/10.1002/bies.201200180>
- de Saint-Jean, M., Delfosse, V., Douguet, D., Chicanne, G., Payraastre, B., Bourguet, W., Antonny, B., & Drin, G. (2011). Osh4p exchanges sterols for phosphatidylinositol 4-phosphate between lipid bilayers. *Journal of Cell Biology*, 195(6), 965–978. <https://doi.org/10.1083/jcb.201104062>
- Degols, G., Shiozaki, K., & Russell, P. (1996). Activation and Regulation of the Spc1 Stress-Activated Protein Kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 16(6), 2870–2877. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.6.2870>
- DELL'ANGELICA, E. C. (2000). Lysosome-related organelles. *The FASEB Journal*, 14(10), 1265–1278. <https://doi.org/10.1096/fj.14.10.1265>
- Demmel, L., Gravert, M., Ercan, E., Habermann, B., Müller-Reichert, T., Kukhtina, V., Haucke, V., Baust, T., Sohrmann, M., Kalaidzidis, Y., Klose, C., Beck, M., Peter, M., & Walch-Solimena, C. (2008). The Clathrin Adaptor Gga2p Is a Phosphatidylinositol 4-phosphate Effector at the Golgi Exit. *Molecular Biology of the Cell*, 19(5), 1991–2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-10-0937>
- Deng, L., Sugiura, R., Takeuchi, M., Suzuki, M., Ebina, H., Takami, T., Koike, A., Iba, S., & Kuno, T. (2006). Real-Time Monitoring of Calcineurin Activity in Living Cells: Evidence for Two Distinct Ca²⁺-dependent Pathways in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 4790–4800. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Deng, Y., Guo, Y., Watson, H., Au, W. C., Shakoury-Elizeh, M., Basrai, M. A., Bonifacino, J. S., & Philpott, C. C. (2009). Gga2 mediates sequential ubiquitin-independent and ubiquitin-dependent steps in the trafficking of ARN1 from the trans-Golgi network to the vacuole. *Journal of Biological Chemistry*, 284(35), 23830–23841. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.030015>
- Di Paolo, G., & De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. In *Nature* (Vol. 443, Issue 7112, pp. 651–657). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature05185>
- Dickson, E. J., Jensen, J. B., & Hille, B. (2014). Golgi and plasma membrane pools of PI(4)P contribute to plasma membrane PI(4,5)P₂ and maintenance of KCNQ2/3 ion channel current. *Proceedings*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(22). <https://doi.org/10.1073/pnas.1407133111>
- Diessl, J., Nandy, A., Schug, C., Habernig, L., & Büttner, S. (2020). Stable and destabilized GFP reporters to monitor calcineurin activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Cell*, 7(4), 106–114. <https://doi.org/10.15698/MIC2020.04.713>
- Dodgson, J., Chessel, A., Vaggi, F., Giordan, M., Yamamoto, M., Arai, K., Madrid, M., Geymonat, M., Abenza, J. F., Cansado, J., Sato, M., Csikasz-Nagy, A., & Salas, R. E. C. (n.d.). *Reconstructing regulatory pathways by systematically mapping protein localization interdependency networks*. <https://doi.org/10.1101/116749>
- Doi, A., Kita, A., Kanda, Y., Uno, T., Asami, K., Satoh, R., Nakano, K., & Sugiura, R. (2015). Geranylgeranyltransferase <scp>C</scp> wg2-Rho4/Rho5 module is implicated in the <scp>P</scp> mk1 <scp>MAP</scp> kinase-mediated cell wall integrity pathway in fission yeast. *Genes to Cells*, 20(4), 310–323. <https://doi.org/10.1111/gtc.12222>
- Dong, X. P., Wang, X., & Xu, H. (2010). TRP channels of intracellular membranes. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 113, Issue 2, pp. 313–328). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06626.x>
- Doray, B., Ghosh, P., Griffith, J., Geuze, H. J., & Kornfeld, S. (2002). Cooperation of GGAs and AP-1 in Packaging MPRs at the Trans-Golgi Network. *Science*, 297(5587), 1700–1703. <https://doi.org/10.1126/science.1075327>
- Doray, B., Liu, L., Lee, W. S., Jennings, B. C., & Kornfeld, S. (2021). Inactivation of the three GGA genes in HeLa cells partially compromises lysosomal enzyme sorting. *FEBS Open Bio*, 11(2), 367–374. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13040>
- Duncan, M. C. (2022). New directions for the clathrin adaptor AP-1 in cell biology and human disease. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 76). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.102079>
- Duncan, M. C., Costaguta, G., & Payne, G. S. (2003). Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a γ -adaptin ear-binding motif. *Nature Cell Biology*, 5(1), 77–81. <https://doi.org/10.1038/ncb901>
- Edreira, T., Celador, R., Manjón, E., & Sánchez, Y. (2020). A novel checkpoint pathway controls actomyosin ring constriction trigger in fission yeast. *ELife*, 9, 1–67. <https://doi.org/10.7554/eLife.59333>
- Edreira, T., Manjón, E., & Sánchez, Y. (2018). The Function of Fission Yeast Rho1-GEFs in the Control of Cell Growth and Division. In *Peripheral Membrane Proteins*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.75913>
- Ejzykowicz, D. E., Locken, K. M., Ruiz, F. J., Manandhar, S. P., Olson, D. K., & Gharakhanian, E. (2017). Hygromycin B hypersensitive (hhy) mutants implicate an intact trans-Golgi and late endosome interface in efficient Tor1 vacuolar localization and TORC1 function. *Current Genetics*, 63(3), 531–551. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0660-9>

- Encinar del Dedo, J., Gabrielli, N., Carmona, M., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2015). A Cascade of Iron-Containing Proteins Governs the Genetic Iron Starvation Response to Promote Iron Uptake and Inhibit Iron Storage in Fission Yeast. *PLoS Genetics*, 11(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005106>
- Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenaue-Tsapis, R., & Belgareh-Touzé, N. (2008). Substrate- and Ubiquitin-Dependent Trafficking of the Yeast Siderophore Transporter Sit1. *Traffic*, 9(8), 1372–1391. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00766.x>
- Eugster, A., Pécheur, E.-I., Michel, F., Winsor, B., Letourneur, F., & Friant, S. (2004). Ent5p Is Required with Ent3p and Vps27p for Ubiquitin-dependent Protein Sorting into the Multivesicular Body. *Molecular Biology of the Cell*, 15(7), 3031–3041. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-11-0793>
- Fell, G. L., Munson, A. M., Croston, M. A., & Rosenwald, A. G. (2011). Identification of Yeast Genes Involved in K⁺ Homeostasis: Loss of Membrane Traffic Genes Affects K⁺ Uptake. *G3 & Genes/Genomes/Genetics*, 1(1), 43–56. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000166>
- Fennessy, D., Grallert, A., Krapp, A., Cokoja, A., Bridge, A. J., Petersen, J., Patel, A., Tallada, V. A., Boke, E., Hodgson, B., Simanis, V., & Hagan, I. M. (2014). Extending the Schizosaccharomyces pombe molecular genetic toolbox. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097683>
- Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D., & Friant, S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast Saccharomyces cerevisiae Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 1509–1525. <https://doi.org/10.3390/ijms16011509>
- Flatman, P. W. (1987). 407 With 12 text-figures THE EFFECTS OF CALCIUM ON POTASSIUM TRANSPORT IN FERRET RED CELLS. In *J. Physiol* (Vol. 386).
- Foote, C., & Nothwehr, S. F. (2006). The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *The Journal of Cell Biology*, 173(4), 615–626. <https://doi.org/10.1083/jcb.200510161>
- Forsburg, S. L., & Rhind, N. (2006). Basic methods for fission yeast. In *Yeast* (Vol. 23, Issue 3, pp. 173–183). <https://doi.org/10.1002/yea.1347>
- Franco, A., Soto, T., Martín-García, R., Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Vicente-Soler, J., Coll, P. M., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2017). Distinct functional relevance of dynamic GTPase cysteine methylation in fission yeast. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06053-x>
- Freeley, M., Kelleher, D., & Long, A. (2011). Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. In *Cellular Signalling* (Vol. 23, Issue 5, pp. 753–762). <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.013>
- Friant, S., Pécheur, E.-I., Eugster, A., Michel, F., Lefkir, Y., Nourrisson, D., & Letourneur, F. (2003). Ent3p Is a PtdIns(3,5)P₂ Effector Required for Protein Sorting to the Multivesicular Body. *Developmental Cell*, 5(3), 499–511. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00238-7](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00238-7)

- Gaidarov, I., & Keen, J. H. (1999). Phosphoinositide–Ap-2 Interactions Required for Targeting to Plasma Membrane Clathrin-Coated Pits. *The Journal of Cell Biology*, 146(4), 755–764. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.4.755>
- Ganesan, S., Shabits, B. N., & Zaremborg, V. (2015). Tracking diacylglycerol and phosphatidic acid pools in budding yeast. *Lipid Insights*, 2015, 75–85. <https://doi.org/10.4137/Lpi.s31781>
- García, P., Celador, R., Pérez-Parrilla, J., & Sánchez, Y. (2022). Fission Yeast Rho1p-GEFs: From Polarity and Cell Wall Synthesis to Genome Stability. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232213888>
- García, P., Tajadura, V., García, I., & Sánchez, Y. (2006). Rgf1p Is a Specific Rho1-GEF That Coordinates Cell Polarization with Cell Wall Biogenesis in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 1620–1631. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-10>
- García, P., Tajadura, V., & Sánchez, Y. (2009). The Rho1p Exchange Factor Rgf1p Signals Upstream from the Pmk1 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 20, 721–731. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08>
- Gaxiola, R. A., Rao, R., Sherman, A., Grisafi, P., Alper, S. L., & Fink, G. R. (1999). The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. In *Genetics* (Vol. 96). www.rserv.uga.edu/rsnewchemi-
- Ghislain, M., Goffeau, A., Halachmin, D., & Eilam, Y. (n.d.). Calcium Homeostasis and Transport Are Affected by Disruption of cta3, a Novel Gene Encoding Ca²⁺-ATPase in Schizosaccharomyces pombe*. In *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* (Vol. 265, Issue 30).
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996). Life with 6000 Genes. *Science*, 274(5287), 546–567. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>
- Golub, E. I. (n.d.). *Volume 16 Number 4 1988 Nucleic Acids Research “One minute” transformation of competent E.coli by plasmid DNA.*
- Gómez-Gil, E., Martín-García, R., Vicente-Soler, J., Franco, A., Vázquez-Marín, B., Prieto-Ruiz, F., Soto, T., Pérez, P., Madrid, M., & Cansado, J. (2020). Stress-activated mapk signaling controls fission yeast actomyosin ring integrity by modulating formin for3 levels. *ELife*, 9, 1–29. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.57951>
- Goossens, A., De, N., Fuente, L. A., Forment, J., Serrano, R., & Portillo, F. (2000). Regulation of Yeast H-ATPase by Protein Kinases Belonging to a Family Dedicated to Activation of Plasma Membrane Transporters. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 20, Issue 20). <http://www.rz.uni>
- Greenall, A., Hadcroft, A. P., Malakasi, P., Jones, N., Morgan, B. A., Hoffman, C. S., & Whitehall, S. K. (2002). Role of fission yeast Tup1-like repressors and Prr1 transcription factor in response to salt stress. *Molecular Biology of the Cell*, 13(9), 2977–2989. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-12-0568>

- Guo, Q., Liu, L., Rupasinghe, T. W. T., Roessner, U., & Barkla, B. J. (2022). Salt stress alters membrane lipid content and lipid biosynthesis pathways in the plasma membrane and tonoplast. *Plant Physiology*, 189(2), 805–826. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac123>
- Gurtovenko, A. A., & Vattulainen, I. (2008). Membrane potential and electrostatics of phospholipid bilayers with asymmetric transmembrane distribution of anionic lipids. *Journal of Physical Chemistry B*, 112(15), 4629–4634. <https://doi.org/10.1021/jp8001993>
- Ha, S.-A., Torabinejad, J., DeWald, D. B., Wenk, M. R., Lucast, L., De Camilli, P., Newitt, R. A., Aebersold, R., & Nothwehr, S. F. (2003). The Synaptojanin-like Protein Inp53/Sjl3 Functions with Clathrin in a Yeast TGN-to-Endosome Pathway Distinct from the GGA Protein-dependent Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 14(4), 1319–1333. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-10-0686>
- Halachmi, D., Ghislain, M., & Eilam, Y. (1992). An intracellular ATP-dependent calcium pump within the yeast *Schizosaccharomyces pombe*, encoded by the gene *cta3*. *European Journal of Biochemistry*, 207(3), 1003–1008. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17136.x>
- Hammond, G. R. V., & Burke, J. E. (2020). Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 63, pp. 57–67). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.007>
- Hammond, G. R. V., Fischer, M. J., Anderson, K. E., Holdich, J., Koteci, A., Balla, T., & Irvine, R. F. (2012). PI4P and PI(4,5)P₂ are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science*, 337(6095), 727–730. <https://doi.org/10.1126/science.1222483>
- Hammond, G. R. V., Sim, Y., Lagnado, L., & Irvine, R. F. (2009). Reversible binding and rapid diffusion of proteins in complex with inositol lipids serves to coordinate free movement with spatial information. *Journal of Cell Biology*, 184(2), 297–308. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809073>
- Hatakeyama, R., Péli-Gulli, M.-P., Hu, Z., Jaquenoud, M., Garcia Osuna, G. M., Sardu, A., Dengjel, J., & De Virgilio, C. (2019). Spatially Distinct Pools of TORC1 Balance Protein Homeostasis. *Molecular Cell*, 73(2), 325–338.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.10.040>
- Haupt, A., Ershov, D., & Minc, N. (2018). A Positive Feedback between Growth and Polarity Provides Directional Persistency and Flexibility to the Process of Tip Growth. *Current Biology*, 28(20), 3342–3351.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.09.022>
- Haupt, A., & Minc, N. (2017). Gradients of phosphatidylserine contribute to plasma membrane charge localization and cell polarity in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 28(1), 210–220. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-06-0353>
- Hayashi, T., Hatanaka, M., Nagao, K., Nakaseko, Y., Kanoh, J., Kokubu, A., Ebe, M., & Yanagida, M. (2007). Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe tor2* mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to Cells*, 12(12), 1357–1370. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01141.x>

- Hercyk, B. S., Rich-Robinson, J., Mitoubsi, A. S., Harrell, M. A., & Das, M. E. (2019). A novel interplay between GEFs orchestrates Cdc42 activity during cell polarity and cytokinesis in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 132(23). <https://doi.org/10.1242/jcs.236018>
- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2003). Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 278(20), 18078–18084. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212900200>
- Hirst, J., Borner, G. H. H., Antrobus, R., Peden, A. A., Hodson, N. A., Sahlender, D. A., & Robinson, M. S. (2012). Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the “knocksideways” system. *Current Biology*, 22(18), 1711–1716. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.012>
- Hirst, J., Borner, G. H. H., Edgar, J., Hein, M. Y., Mann, M., Buchholz, F., Antrobus, R., & Robinson, M. S. (2013). Interaction between AP-5 and the hereditary spastic paraplegia proteins SPG11 and SPG15. *Molecular Biology of the Cell*, 24(16), 2558–2569. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-03-0170>
- Hirst, J., Lindsay, M. R., & Robinson, M. S. (2001). GGAs: Roles of the Different Domains and Comparison with AP-1 and Clathrin. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 12).
- Hirst, J., Lui, W. W. Y., Bright, N. A., Totty, N., Seaman, M. N. J., & Robinson, M. S. (2000). A Family of Proteins with γ -Adaptin and Vhs Domains That Facilitate Trafficking between the Trans-Golgi Network and the Vacuole/Lysosome. *The Journal of Cell Biology*, 149(1), 67–80. <https://doi.org/10.1083/jcb.149.1.67>
- Hirst, J., Miller, S. E., Taylor, M. J., von Mollard, G. F., & Robinson, M. S. (2004). EpsinR Is an Adaptor for the SNARE Protein Vti1b. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5593–5602. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-06-0468>
- Hirst, J., Motley, A., Harasaki, K., Peak Chew, S. Y., & Robinson, M. S. (2003). EpsinR: an ENTH Domain-containing Protein that Interacts with AP-1 □ V. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 625–641. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-09>
- Hirst, J., & Robinson, M. S. (1998). Clathrin and adaptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1404(1–2), 173–193. [https://doi.org/10.1016/S0167-4889\(98\)00056-1](https://doi.org/10.1016/S0167-4889(98)00056-1)
- Hirst, J., Schlacht, A., Norcott, J. P., Traynor, D., Bloomfield, G., Antrobus, R., Kay, R. R., Dacks, J. B., & Robinson, M. S. (2014). Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *ELife*, 2014(3). <https://doi.org/10.7554/elife.02866>
- Horisberger, M., & Rosset, J. (1977). Localization of β -galactomannan on the surface of *Schizosaccharomyces pombe* cells by scanning electron microscopy. *Archives of Microbiology*, 112(2), 123–126. <https://doi.org/10.1007/BF00429323>

- Howell, G. J., Holloway, Z. G., Cobbold, C., Monaco, A. P., & Ponnambalam, S. (2006). *Cell Biology of Membrane Trafficking in Human Disease* (pp. 1–69). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(06\)52005-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(06)52005-4)
- Howland, J. L. (1996). Short protocols in molecular biology, third edition: Edited by F Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith and K Struhl. P 836. John Wiley & Sons, New York. 1995. \$74.95. ISBN 0-471-13781-2. *Biochemical Education*, 24(1), 68–68. <https://doi.org/10.1002/bmb.1996.5690240143>
- Hoya, M. (2016). *El exómero de Schizosaccharomyces pombe colabora en el tráfico vesicular entre el aparato de Golgi y el sistema endosomal*.
- Hoya, M., Yanguas, F., Moro, S., Prescianotto-Baschong, C., Doncel, C., de León, N., Curto, M. Á., Spang, A., & Valdivieso, M. H. (2017a). Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics*, 205(2), 673–690. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193458>
- Hoya, M., Yanguas, F., Moro, S., Prescianotto-Baschong, C., Doncel, C., de León, N., Curto, M. Á., Spang, A., & Valdivieso, M. H. (2017b). Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics*, 205(2), 673–690. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193458>
- Hung, C. W., Aoh, Q. L., Joglekar, A. P., Payne, G. S., & Duncan, M. C. (2012). Adaptor autoregulation promotes coordinated binding within clathrin coats. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17398–17407. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.349035>
- Huotari, J., & Helenius, A. (2011). Endosome maturation. In *EMBO Journal* (Vol. 30, Issue 17, pp. 3481–3500). <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.286>
- Huranova, M., Muruganandam, G., Weiss, M., & Spang, A. (2016). Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Reports*, 17(2), 202–219. <https://doi.org/10.15252/embr.201540795>
- Huyton, T., Bates, P. A., Zhang, X., Sternberg, M. J. E., & Freemont, P. S. (2000). The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutation Research/DNA Repair*, 460(3–4), 319–332. [https://doi.org/10.1016/S0921-8777\(00\)00034-3](https://doi.org/10.1016/S0921-8777(00)00034-3)
- Ikeda, K., Morigasaki, S., Tatebe, H., Tamanoi, F., & Shiozaki, K. (n.d.). *Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control*.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. In *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* (Vol. 153, Issue 1).
- Iwaki, T., Iefuji, H., Hiraga, Y., Hosomi, A., Morita, T., Giga-Hama, Y., & Takegawa, K. (2008). Multiple functions of ergosterol in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*, 154(3), 830–841. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/011155-0>
- Jackson, C. L., Walch, L., & Verbavatz, J. M. (2016). Lipids and Their Trafficking: An Integral Part of Cellular Organization. In *Developmental Cell* (Vol. 39, Issue 2, pp. 139–153). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.030>

- Johansen, J., Ramanathan, V., & Beh, C. T. (2012). Vesicle trafficking from a lipid perspective. *Cellular Logistics*, 2(3), 151–160. <https://doi.org/10.4161/cl.20490>
- Kabeche, R., Madrid, M., Cansado, J., & Moseley, J. B. (2015). Eisosomes regulate phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PI(4,5)P₂) cortical clusters and mitogen-activated protein (MAP) kinase signaling upon osmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*, 290(43), 25960–25973. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.674192>
- Kanda, Y., Satoh, R., Matsumoto, S., Ikeda, C., Inutsuka, N., Hagihara, K., Matzno, S., Tsujimoto, S., Kita, A., & Sugiura, R. (2016). Skb5, an SH3 adaptor protein, regulates Pmk1 MAPK signaling by controlling the intracellular localization of the MAPKKK Mkh1. *Journal of Cell Science*, 129(16), 3189–3202. <https://doi.org/10.1242/jcs.188854>
- Kanda, Y., Satoh, R., Takasaki, T., Tomimoto, N., Tsuchiya, K., Tsai, C. A., Tanaka, T., Kyomoto, S., Hamada, K., Fujiwara, T., & Sugiura, R. (2021). Sequestration of the PKC ortholog Pck2 in stress granules as a feedback mechanism of MAPK signaling in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 134(2). <https://doi.org/10.1242/jcs.250191>
- Karim, M. A., & Brett, C. L. (2018). The Na⁺(K⁺)/H⁺ exchanger Nhx1 controls multivesicular body-vacuolar lysosome fusion. *Molecular Biology of the Cell*, 29(3), 317–325. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-08-0496>
- Kawai, Not Available, N. A., Not Available, N. A., Not Available, N. A., Not Available, N. A., Not Available, N. A., & Not Available, N. A. (2001). Fission yeast Tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Current Genetics*, 39(3), 166–174. <https://doi.org/10.1007/s002940100198>
- Kinclová, O., Potier, S., & Sychrová, H. (2002). Difference in substrate specificity divides the yeast alkali-metal-cation/H⁺ antiporters into two subfamilies. *Microbiology*, 148(4), 1225–1232. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-4-1225>
- Kirchhausen, T., & Harrison, S. C. (1981). Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23(3), 755–761. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90439-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90439-6)
- Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y., & Sugiura, R. (2011). Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome Trafficking through Functional Interaction with Adaptin in Fission Yeast. *PLoS ONE*, 6(2), e16842. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016842>
- Kita, A., Sugiura, R., Shoji, H., He, Y., Deng, L., Lu, Y., Sio, S. O., Takegawa, K., Sakaue, M., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2004). Loss of Apm1, the 1 Subunit of the Clathrin-Associated Adaptor-Protein-1 Complex, Causes Distinct Phenotypes and Synthetic Lethality with Calcineurin Deletion in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 2920–2931. <https://doi.org/10.1091/mbc.E03-09>
- Kodedová, M., & Sychrová, H. (2015). Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139306>

- Kojima, A., Toshima, J. Y., Kanno, C., Kawata, C., & Toshima, J. (2012). Localization and functional requirement of yeast Na⁺/H⁺ exchanger, Nhx1p, in the endocytic and protein recycling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1823(2), 534–543. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.12.004>
- Koyano, T., Fujimoto, T., Onishi, K., Matsuyama, M., Fukushima, M., & Kume, K. (2023). Pkd2, mutations linking to autosomal dominant polycystic kidney disease, localizes to the endoplasmic reticulum and regulates calcium signaling in fission yeast. *Genes to Cells*, 28(11), 811–820. <https://doi.org/10.1111/gtc.13069>
- Kume, K., Koyano, T., Kanai, M., Toda, T., & Hirata, D. (2011). Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nature Cell Biology*, 13(3), 234–242. <https://doi.org/10.1038/ncb2166>
- Kushner, 1978. (n.d.).
- Lafer, E. M. (2002). Clathrin–Protein Interactions. *Traffic*, 3(8), 513–520. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2002.30801.x>
- Laplante, M., & Sabatini, D. M. (2012). mTOR Signaling in Growth Control and Disease. *Cell*, 149(2), 274–293. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>
- Lawrence, C. L., Maekawa, H., Worthington, J. L., Reiter, W., Wilkinson, C. R. M., & Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 Protein Levels by Sty1-mediated Phosphorylation and Heterodimerization with Pcr1. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5160–5170. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608526200>
- Lawrence, R. E., & Zoncu, R. (2019). The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 2, pp. 133–142). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0244-7>
- Lemmon, S. K., & Traub, L. M. (2000). Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(4), 457–466. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00117-4](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00117-4)
- Leonard, T. A., Loose, M., & Martens, S. (2023). The membrane surface as a platform that organizes cellular and biochemical processes. *Developmental Cell*, 58(15), 1315–1332. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2023.06.001>
- Leto, D., & Saltiel, A. R. (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(6), 383–396. <https://doi.org/10.1038/nrm3351>
- Leupold, U. (1949). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Ser. Physiol.*, 24, 381–480.
- Leupold, U. (1958). Studies on Recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 23(0), 161–170. <https://doi.org/10.1101/SQB.1958.023.01.020>

- Levine, T. P., & Munro, S. (2002). Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both PtdIns 4-Kinase-Dependent and-Independent Components 4, and 5) to produce seven different phosphoinositides. By restricting the action of the individual kinases to a subset of membranes and in some cases coupling their action to activation by signaling pathways the cell is able to use specific phosphoinositides to control the. In *Current Biology* (Vol. 12). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/>
- Li, C., Kita, A., Hashimoto, Y., Ihara, M., Kato, A., Ogura, N., Doi, A., Oku, M., Itoh, T., Sakai, Y., & Sugiura, R. (2014). Functional link between Rab GTPase-mediated membrane trafficking and PI4,5P2 signaling. *Genes to Cells*, 19(3), 177–197. <https://doi.org/10.1111/gtc.12123>
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., & Höfer, M. (1996a). Functional characterization of *Schizosaccharomyces pombe* genes cloned in potassium transport defective yeast strains. *Folia Microbiologica*, 41(1), 105–106. <https://doi.org/10.1007/BF02816360>
- Lichtenberg-Fraté, H., Reid, J. D., Heyer, M., & Höfer, M. (1996b). The SpTRK Gene Encodes a Potassium-specific Transport Protein TKH p in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Membrane Biology*, 152(2), 169–181. <https://doi.org/10.1007/s002329900095>
- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S. F., & Graham, T. R. (2008). P4-ATPase Requirement for AP-1/Clathrin Function in Protein Transport from the *trans*-Golgi Network and Early Endosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), 3526–3535. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-01-0025>
- Loewith, R., Hubberstey, A., & Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Cell Science*, 113(1), 153–160. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.1.153>
- Lui, W. W. Y., Collins, B. M., Hirst, J., Motley, A., Millar, C., Schu, P., Owen, D. J., & Robinson, M. S. (2003). Binding Partners for the COOH-Terminal Appendage Domains of the GGAs and γ -Adaptin. *Molecular Biology of the Cell*, 14(6), 2385–2398. <https://doi.org/10.1091/mbc.e02-11-0735>
- Lujan, P., Angulo-Capel, J., Chabanon, M., & Campelo, F. (2021). Interorganelle communication and membrane shaping in the early secretory pathway. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 71, pp. 95–102). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.01.010>
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., & Sugiura, R. (2006). Rho2 Is a Target of the Farnesyltransferase Cpp1 and Acts Upstream of Pmk1 Mitogen-activated Protein Kinase Signaling in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 5028–5037. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Ma, Y., Sugiura, R., Koike, A., Ebina, H., Sio, S. O., & Kuno, T. (2011). Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PLoS ONE*, 6(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022421>
- Ma, Y., Takeuchi, M., Sugiura, R., Sio, S. O., & Kuno, T. (2009). Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes to Cells*, 14(8), 1015–1028. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01327.x>

- Madrid, M., Jiménez, R., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2014). Multiple regulatory levels influence cell integrity control by PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of Cell Science*. <https://doi.org/10.1242/jcs.158295>
- Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Molecular Biology of the Cell*, 18(11), 4405–4419. <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-05-0484>
- Madrid, M., Soto, T., Hou, K. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., & Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(4), 2033–2043. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506467200>
- Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2016). Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37515>
- Madrid, M., Vázquez-Marín, B., Soto, T., Franco, A., Gómez-Gil, E., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2017). Differential functional regulation of protein kinase C (PKC) orthologs in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 292(27), 11374–11387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786087>
- Madrid, R., Gó Mez S, M. J., Ramos, J., & Rodríguez-Navarro, A. (1998). *Ectopic Potassium Uptake in trk1 trk2 Mutants of Saccharomyces cerevisiae Correlates with a Highly Hyperpolarized Membrane Potential**. <http://www.jbc.org>
- Magliozzi, J. O., Sears, J., Cressey, L., Brady, M., Opalko, H. E., Kettenbach, A. N., & Moseley, J. B. (2020). Fission yeast Pak1 phosphorylates anillin-like Mid1 for spatial control of cytokinesis. *Journal of Cell Biology*, 219(8). <https://doi.org/10.1083/jcb.201908017>
- Makarova, M., Gu, Y., Chen, J. S., Beckley, J. R., Gould, K. L., & Oliferenko, S. (2016). Temporal Regulation of Lipin Activity Diverged to Account for Differences in Mitotic Programs. *Current Biology*, 26(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.061>
- Malla, M., Sinha, D., Chowdhury, P., Thomas Bisesi, B., & Chen, Q. (2023). The cytoplasmic tail of the mechanosensitive channel Pkd2 regulates its internalization and clustering in eisosomes. *Journal of Cell Science*, 136(12). <https://doi.org/10.1242/jcs.260598>
- Marek, M., Vincenzetti, V., & Martin, S. G. (2020). Sterol biosensor reveals LAM-family Itc1-dependent sterol flow to endosomes upon arp2/3 inhibition. *Journal of Cell Biology*, 219(6). <https://doi.org/10.1083/JCB.202001147>
- Martens, J. R., O'Connell, K., & Tamkun, M. (2004). Targeting of ion channels to membrane microdomains: Localization of K V channels to lipid rafts. In *Trends in Pharmacological Sciences* (Vol. 25, Issue 1, pp. 16–21). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2003.11.007>

- Martin, T. F. J. (2015). PI(4,5)P₂-binding effector proteins for vesicle exocytosis. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1851, Issue 6, pp. 785–793). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.017>
- Martín-García, R., De León, N., Sharifmoghadam, M. R., Curto, M. Á., Hoya, M., Bustos-Sanmamed, P., & Valdivieso, M. H. (2011). The FN3 and BRCT motifs in the exomer component Chs5p define a conserved module that is necessary and sufficient for its function. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(17), 2907–2917. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0596-z>
- Matsuo, T. (2003). Schizosaccharomyces pombe AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO Journal*, 22(12), 3073–3083. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg298>
- Mccullough, J., Fisher, R. D., Whitby, F. G., Sundquist, W. I., & Hill, C. P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. www.pnas.org/cgi/content/full/
- Mcleod, M., Stein, M., & Beach, D. (1987). The product of the mei3+ gene, expressed under control of the mating-type locus, induces meiosis and sporulation in fission yeast. In *The ENIBO Journal* (Vol. 6, Issue 3).
- McMahon, H. T., & Boucrot, E. (2015). Membrane curvature at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(6), 1065–1070. <https://doi.org/10.1242/jcs.114454>
- Meng, X., Wijaya, C. S., Shao, Q., & Xu, S. (2023). Triggered Golgi membrane enrichment promotes PtdIns(4,5)P₂ generation for plasma membrane repair. *Journal of Cell Biology*, 222(8). <https://doi.org/10.1083/jcb.202303017>
- Mesmin, B., Bigay, J., Polidori, J., Jamecna, D., Lacas-Gervais, S., & Antonny, B. (2017). Sterol transfer, PI 4P consumption, and control of membrane lipid order by endogenous OSBP. *The EMBO Journal*, 36(21), 3156–3174. <https://doi.org/10.15252/emboj.201796687>
- Mesmin, B., Kovacs, D., & D'Angelo, G. (2019). Lipid exchange and signaling at ER–Golgi contact sites. In *Current Opinion in Cell Biology* (Vol. 57, pp. 8–15). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.10.002>
- Millar, J. B., Buck, V., & Wilkinson, M. G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & Development*, 9(17), 2117–2130. <https://doi.org/10.1101/gad.9.17.2117>
- Mills, I. G., Praefcke, G. J. K., Vallis, Y., Peter, B. J., Olesen, L. E., Gallop, J. L., Butler, P. J. G., Evans, P. R., & McMahon, H. T. (2003). EpsinR. *The Journal of Cell Biology*, 160(2), 213–222. <https://doi.org/10.1083/jcb.200208023>
- Misra, S., Puertollano, R., Kato, Y., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2002). Structural basis for acidic-cluster-dileucine sorting-signal recognition by VHS domains. *Nature*, 415(6874), 933–937. <https://doi.org/10.1038/415933a>
- Moreno, S., Klar, A., & Nurse, P. (1991). [56] *Molecular genetic analysis of fission yeast Schizosaccharomyces pombe* (pp. 795–823). [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94059-L](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94059-L)

- Morigasaki, S., Chein Chin, L., Hatano, T., Emori, M., Iwamoto, M., Tatebe, H., & Shiozaki, K. (2019). Modulation of TOR complex 2 signaling by the stress-activated MAPK pathway in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 132(19). <https://doi.org/10.1242/jcs.236133>
- Moro, S. (2018). *Implicación del exómero en la respuesta a estrés de Schizosaccharomyces pombe*.
- Moro, S., Moscoso-Romero, E., Poddar, A., Mulet, J. M., Perez, P., Chen, Q., & Valdivieso, M.-H. (2021). Exomer Is Part of a Hub Where Polarized Secretion and Ionic Stress Connect. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.708354>
- Morris, Z., Sinha, D., Poddar, A., Morris, B., & Chen, Q. (2019). Fission yeast TRP channel Pkd2p localizes to the cleavage furrow and regulates cell separation during cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 30(15), 1791–1804. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0270>
- Mousley, C. J., Yuan, P., Gaur, N. A., Trettin, K. D., Nile, A. H., Deminoff, S. J., Dewar, B. J., Wolpert, M., MacDonald, J. M., Herman, P. K., Hinnebusch, A. G., & Bankaitis, V. A. (2012). A sterol-binding protein integrates endosomal lipid metabolism with TOR signaling and nitrogen sensing. *Cell*, 148(4), 702–715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.026>
- Mulet, J. M., Leube, M. P., Stephen, †, Kron, J., Rios, ‡ Gabino, Fink, G. R., & Serrano, R. (1999). A Novel Mechanism of Ion Homeostasis and Salt Tolerance in Yeast: the Hal4 and Hal5 Protein Kinases Modulate the Trk1-Trk2 Potassium Transporter. In *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* (Vol. 19, Issue 5).
- Mulet, J. M., Llopis-Torregrosa, V., Primo, C., Marqués, M. C., & Yenush, L. (2013). Endocytic regulation of alkali metal transport proteins in mammals, yeast and plants. *Current Genetics*, 59(4), 207–230. <https://doi.org/10.1007/s00294-013-0401-2>
- Muñoz, S., Manjón, E., García, P., Sunnerhagen, P., & Sánchez, Y. (2014). The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Molecular Biology of the Cell*, 25(7), 1137–1150. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-11-0689>
- Mutavchiev, D. R., Leda, M., & Sawin, K. E. (2016). Remodeling of the Fission Yeast Cdc42 Cell-Polarity Module via the Sty1 p38 Stress-Activated Protein Kinase Pathway. *Current Biology*, 26(21), 2921–2928. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.048>
- Nakano, K., Arai, R., & Mabuchi, I. (1997). The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes to Cells*, 2, 679–694.
- Neeli-Venkata, R., Diaz, C. M., Celador, R., Sanchez, Y., & Minc, N. (2021). Detection of surface forces by the cell-wall mechanosensor Wsc1 in yeast. *Developmental Cell*, 56(20), 2856–2870. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.09.024>
- Nelstuen, G. L., & Bazzi, M. D. (1991). MINI-REVIEW Activation and Regulation of Protein Kinase C Enzymes. In *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* (Vol. 23, Issue 1).

- Newton, A. C. (2018). Protein kinase C: perfectly balanced. In *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* (Vol. 53, Issue 2, pp. 208–230). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1442408>
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W., & Shiozaki, K. (2000). Multistep Phosphorelay Proteins Transmit Oxidative Stress Signals to the Fission Yeast Stress-activated Protein Kinase. *Molecular Biology of the Cell*, 11(4), 1169–1181. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.4.1169>
- Nishikawa, T., Aiba, H., & Mizuno, T. (1999). The *cta3+* gene that encodes a cation-transporting P-type ATPase is induced by salt stress under control of the Wis1-Sty1 MAPKK-MAPK cascade in fission yeast. *FEBS Letters*, 455(1–2), 183–187. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00876-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00876-5)
- O'Donnell, A. F., Apffel, A., Gardner, R. G., & Cyert, M. S. (2010). α -Arrestins Aly1 and Aly2 Regulate Intracellular Trafficking in Response to Nutrient Signaling. *Molecular Biology of the Cell*, 21(20), 3552–3566. <https://doi.org/10.1091/mbc.e10-07-0636>
- Odorizzi, G., Babst, M., & Emr, S. D. (2000). Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(5), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(00\)01543-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(00)01543-7)
- Ogden, J. E., & Fantes, P. A. (1986). Isolation of a novel type of mutation in the mitotic control of *Schizosaccharomyces pombe* whose phenotypic expression is dependent on the genetic background and nutritional environment. *Current Genetics*, 10(7), 509–514. <https://doi.org/10.1007/BF00447384>
- Otsubo, Y., & Yamamoto, M. (2008). TOR Signaling in Fission Yeast. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 43(4), 277–283. <https://doi.org/10.1080/10409230802254911>
- Paczkowski, J. E., & Fromme, J. C. (2014). Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Developmental Cell*, 30(5), 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.07.014>
- Paczkowski, J. E., & Fromme, J. C. (2016). Analysis of Arf1 GTPase-dependent membrane binding and remodeling using the exomer secretory vesicle cargo adaptor. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1496, pp. 41–53). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6463-5_4
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., & Fromme, J. C. (2015). Cargo adaptors: Structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 25, Issue 7, pp. 408–416). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.02.005>
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., Strassner, A. M., & Christopher Fromme, J. (2012). The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO Journal*, 31(21), 4191–4203. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.268>
- Page, L. J., Sowerby, P. J., Lui, W. W. Y., & Robinson, M. S. (1999). γ -Synergins. *The Journal of Cell Biology*, 146(5), 993–1004. <https://doi.org/10.1083/jcb.146.5.993>

- Palade, G. (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*, 189(4200), 347–358.
- Palmer, C. P., Aydar, E., & Djamgoz, M. B. A. (2005). A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. In *Biochem. J* (Vol. 387). <http://www.sbc.su.se/>
- Papadakis, M. A., & Workman, C. T. (2015). Oxidative stress response pathways: Fission yeast as archetype. In *Critical Reviews in Microbiology* (Vol. 41, Issue 4, pp. 520–535). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.870968>
- Park, J. S., Steinbach, S. K., Desautels, M., & Hemmingsen, S. M. (2009). Essential role for *Schizosaccharomyces pombe* pik1 in septation. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006179>
- Park, S. Y., & Guo, X. (2014). Adaptor protein complexes and intracellular transport. In *Bioscience Reports* (Vol. 34, Issue 4, pp. 381–390). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BSR20140069>
- Patterson, G. H., Hirschberg, K., Polishchuk, R. S., Gerlich, D., Phair, R. D., & Lippincott-Schwartz, J. (n.d.). *Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system*.
- Peden, A. A., Oorschot, V., Hesser, B. A., Austin, C. D., Scheller, R. H., & Klumperman, J. (2004). Localization of the AP-3 adaptor complex defines a novel endosomal exit site for lysosomal membrane proteins. *Journal of Cell Biology*, 164(7), 1065–1076. <https://doi.org/10.1083/jcb.200311064>
- Perez, P., & Cansado, J. (2010). Cell Integrity Signaling and Response to Stress in Fission Yeast. *Current Protein & Peptide Science*, 11(8), 680–692. <https://doi.org/10.2174/138920310794557718>
- Pérez, P., Cortés, J. C. G., Cansado, J., & Ribas, J. C. (2018). Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. In *Cell Surface* (Vol. 4, pp. 1–9). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.10.001>
- Pérez-Valle, J., Rothe, J., Primo, C., Pastor, M. M., Ariño, J., Pascual-Ahuir, A., Mulet, J., Serrano, R., & Yenush, L. (2010). Hal4 and Hal5 protein kinases are required for general control of carbon and nitrogen uptake and metabolism. *Eukaryotic Cell*, 9(12), 1881–1890. <https://doi.org/10.1128/EC.00184-10>
- Petersen, J., & Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature Cell Biology*, 9(11), 1263–1272. <https://doi.org/10.1038/ncb1646>
- Phan, H. L., Finlay, J. A., Chu, D. S., Tan, P. K., Kirchhausen, T., & Payne, G. S. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* APS1 gene encodes a homolog of the small subunit of the mammalian clathrin AP-1 complex: evidence for functional interaction with clathrin at the Golgi complex. *The EMBO Journal*, 13(7), 1706–1717. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06435.x>

- Piao, H., Maclean Freed, J., & Mayinger, P. (2012). Metabolic Activation of the HOG MAP Kinase Pathway by Snf1/AMPK Regulates Lipid Signaling at the Golgi. *Traffic*, 13(11), 1522–1531. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2012.01406.x>
- Piao, H., & Mayinger, P. (2012). Growth and metabolic control of lipid signalling at the Golgi. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 40, Issue 1, pp. 205–209). <https://doi.org/10.1042/BST20110637>
- Platre, M. P., & Jaillais, Y. (2017). Anionic lipids and the maintenance of membrane electrostatics in eukaryotes. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 12, Issue 2). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1282022>
- Poddar, A., Hsu, Y. Y., Zhang, F., Shamma, A., Kreais, Z., Muller, C., Malla, M., Ray, A., Liu, A. P., & Chen, Q. (2022). Membrane stretching activates calcium permeability of a putative channel Pkd2 during fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 33(14). <https://doi.org/10.1091/mbc.E22-07-0248>
- Poddar, A., Sidibe, O., Ray, A., & Chen, Q. (2021). Calcium spikes accompany cleavage furrow ingression and cell separation during fission yeast cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, 32(1), 15–27. <https://doi.org/10.1091/MBC.E20-09-0609>
- Posor, Y., Jang, W., & Haucke, V. (2022). Phosphoinositides as membrane organizers. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 12, pp. 797–816). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00490-x>
- Prieto-Ruiz, F., Vicente-Soler, J., Franco, A., Gómez-Gil, E., Sánchez-Marinas, M., Vázquez-Marín, B., Aligué, R., Madrid, M., Moreno, S., Soto, T., & Cansado, J. (2020). RNA-binding protein Rnc1 regulates cell length at division and acute stress response in fission yeast through negative feedback modulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *MBio*, 11(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.02815-19>
- Puertollano, R., Aguilar, R. C., Gorshkova, I., Crouch, R. J., & Bonifacino, J. S. (2001). Sorting of Mannose 6-Phosphate Receptors Mediated by the GGAs. *Science*, 292(5522), 1712–1716. <https://doi.org/10.1126/science.1060750>
- Raiborg, C. (2001). Hrs recruits clathrin to early endosomes. *The EMBO Journal*, 20(17), 5008–5021. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.17.5008>
- Ramírez, J., Ramírez, O., Saldaña, C., Coria, R., & Peña, A. (1998). A *Saccharomyces cerevisiae* Mutant Lacking a K⁺/H⁺ Exchanger. *Journal of Bacteriology*, 180(22).
- Ramirez-Macias, I., Barlow, L. D., Anton, C., Spang, A., Roncero, C., & Dacks, J. B. (2018). Evolutionary cell biology traces the rise of the exomer complex in Fungi from an ancient eukaryotic component. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29416-4>
- Ramos, J., Ariño, J., & Sychrová, H. (2011). Alkali-metal-cation influx and efflux systems in nonconventional yeast species. *FEMS Microbiology Letters*, 317(1), 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02214.x>

- Reider, A., & Wendland, B. (2011). Endocytic adaptors – social networking at the plasma membrane. *Journal of Cell Science*, 124(10), 1613–1622. <https://doi.org/10.1242/jcs.073395>
- Ren, X., Farías, G. G., Canagarajah, B. J., Bonifacino, J. S., & Hurley, J. H. (2013). Structural Basis for Recruitment and Activation of the AP-1 Clathrin Adaptor Complex by Arf1. *Cell*, 152(4), 755–767. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.042>
- Ríos, G., Cabedo, M., Rull, B., Yenush, L., Serrano, R., & Mulet, J. M. (2013). Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Research*, 13(1), 97–106. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12013>
- Ritz, A. M., Trautwein, M., Grassinger, F., & Spang, A. (2014). The prion-like domain in the exomer-dependent cargo pin2 serves as a trans-golgi retention motif. *Cell Reports*, 7(1), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.026>
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A., & Foster, S. D. (2010). Rapid Inactivation of Proteins by Rapamycin-Induced Rerouting to Mitochondria. *Developmental Cell*, 18(2), 324–331. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.12.015>
- Rockenbach, U., Ritz, A. M., Sacristan, C., Roncero, C., & Spang, A. (2012). The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Molecular Biology of the Cell*, 23(22), 4402–4415. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1015>
- Rohde, G., Wenzel, D., & Haucke, V. (2002). A phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate binding site within μ 2-adaptin regulates clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of Cell Biology*, 158(2), 209–214. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203103>
- Roncero, C., Celador, R., Sánchez, N., García, P., & Sánchez, Y. (2021). The role of the cell integrity pathway in septum assembly in yeast. In *Journal of Fungi* (Vol. 7, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/jof7090729>
- Sahgal, P., Alanko, J., Icha, J., Paatero, I., Hamidi, H., Arjonen, A., Pietila, M., Rokka, A., & Ivaska, J. (2019). GGA2 and RAB13 promote activity-dependent β 1-integrin recycling. *Journal of Cell Science*, 132(11). <https://doi.org/10.1242/jcs.233387>
- Sakamoto C, Kawamoto C, Takeuchi K, Miyamoto I, & Shuntoh H. (2004). Fission yeast epsin, Ent1p is required for endocytosis and involved in actin organization. *Kobe J Med Sci*, Jan;50((1-2)), 47–57.
- Salat-Canela, C., Carmona, M., Martín-García, R., Pérez, P., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2021). Stress-dependent inhibition of polarized cell growth through unbalancing the GEF/GAP regulation of Cdc42. *Cell Reports*, 37(5). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109951>
- Sambrook, J. (n.d.). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Third edition. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory Press, [2001] ©2001. <https://search.library.wisc.edu/catalog/999897924602121>
- Sammons, M. R., James, M. L., Clayton, J. E., Sladewski, T. E., Sirotkin, V., & Lord, M. (2011). A calmodulin-related light chain from fission yeast that functions with myosin-I and PI 4-kinase. *Journal of Cell Science*, 124(14), 2466–2477. <https://doi.org/10.1242/jcs.067850>

- Sanchatjate, S., & Schekman, R. (2006). Chs5/6 Complex: A Multiprotein Complex That Interacts with and Conveys Chitin Synthase III from the Trans-Golgi Network to the Cell Surface. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 4157–4166. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06>
- Sánchez-Mir, L., Franco, A., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Villar-Tajadura, M. A., Soto, T., Pérez, P., Gacto, M., & Cansado, J. (2012). Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 287(31), 26038–26051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345611>
- Sánchez-Mir, L., Franco, A., Martín-García, R., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Soto, T., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2014). Rho2 Palmitoylation Is Required for Plasma Membrane Localization and Proper Signaling to the Fission Yeast Cell Integrity Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 34(14), 2745–2759. <https://doi.org/10.1128/mcb.01515-13>
- Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R. A., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2014). Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088020>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (DNA polymerase/nucleotide sequences/bacteriophage 4X174)* (Vol. 74, Issue 12).
- Santos, B., Duran, A., & Valdivieso, M. H. (1997). *CHS5*, a Gene Involved in Chitin Synthesis and Mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2485–2496. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2485>
- Santos, B., & Snyder, M. (1997). Targeting of Chitin Synthase 3 to Polarized Growth Sites in Yeast Requires Chs5p and Myo2p. In *The Journal of Cell Biology* (Vol. 136, Issue 1).
- Santos, B., & Snyder, M. (2003). Specific protein targeting during cell differentiation: Polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 2(4), 821–825. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.821-825.2003>
- Sarkadi, 1985; *Analysis of Ca²⁺-induced K⁺-transport of human erythrocytes in propionate media*. (n.d.).
- Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., & Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding Protein Nrd1 and Pmk1 Mitogen-activated Protein Kinase in the Regulation of Myosin mRNA Stability in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 20(9), 2473–2485. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0893>
- Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T., & Parker, P. J. (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes to Cells*, 5(1), 17–27. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00301.x>
- Schink, K. O., Tan, K. W., & Stenmark, H. (2016). Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32, 143–171. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125349>

- Schlecht, U., Miranda, M., Suresh, S., Davis, R. W., & St.Onge, R. P. (2012). Multiplex assay for condition-dependent changes in protein–protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(23), 9213–9218. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204952109>
- Scott, C. C., & Gruenberg, J. (2011). Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: PH is just the start: The flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. *BioEssays*, 33(2), 103–110. <https://doi.org/10.1002/bies.201000108>
- Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Kearney, W. R., Robertson, A. D., Boman, A. L., & Piper, R. C. (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nature Cell Biology*, 6(3), 252–259. <https://doi.org/10.1038/ncb1107>
- Seifikalhor, M., Aliniaiefard, S., Shomali, A., Azad, N., Hassani, B., Lastochkina, O., & Li, T. (2019). Calcium signaling and salt tolerance are diversely entwined in plants. In *Plant Signaling and Behavior* (Vol. 14, Issue 11). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/15592324.2019.1665455>
- Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J., & Young, D. (1997). Mkh1, a MEK Kinase Required for Cell Wall Integrity and Proper Response to Osmotic and Temperature Stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and Cellular Biology*, 17(7), 3508–3519. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.7.3508>
- Shiba, Y., Katoh, Y., Shiba, T., Yoshino, K., Takatsu, H., Kobayashi, H., Shin, H.-W., Wakatsuki, S., & Nakayama, K. (2004). GAT (GGA and Tom1) Domain Responsible for Ubiquitin Binding and Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 7105–7111. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311702200>
- Shieh, J.-C., Martin, H., & Millar, J. B. A. (1998). Evidence for a novel MAPKKK-independent pathway controlling the stress activated Sty1/Spc1 MAP kinase in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 111(18), 2799–2807. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.18.2799>
- Shieh, J.-C., Wilkinson, M. G., & Millar, J. B. A. (1998). The Win1 Mitotic Regulator Is a Component of the Fission Yeast Stress-activated Sty1 MAPK Pathway. *Molecular Biology of the Cell*, 9(2), 311–322. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.2.311>
- Shikano, S., & Colley, K. J. (2013). Secretory Pathway. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition* (pp. 203–209). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00507-7>
- Shimizu, Y., Takagi, J., Ito, E., Ito, Y., Ebine, K., Komatsu, Y., Goto, Y., Sato, M., Toyooka, K., Ueda, T., Kurokawa, K., Uemura, T., & Nakano, A. (2021). Cargo sorting zones in the trans-Golgi network visualized by super-resolution confocal live imaging microscopy in plants. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22267-0>
- Shimobayashi, M., & Hall, M. N. (2014). Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 155–162. <https://doi.org/10.1038/nrm3757>

- Shiozaki, K., & Russell, P. (1995). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *The EMBO Journal*, 14(3), 492–502. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07025.x>
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., & Russell, P. (1997). Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Molecular Biology of the Cell*, 8(3), 409–419. <https://doi.org/10.1091/mbc.8.3.409>
- Shiozaki, K., Shiozaki, M., & Russell, P. (1998). Heat Stress Activates Fission Yeast Spc1/Styl MAPK by a MEKK-Independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell*, 9(6), 1339–1349. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.6.1339>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. In *Nature* © Macmillan Publishers Ltd (Vol. 387).
- Singer-Krüger, B., Lasić, M., Bürger, A.-M., Haußer, A., Pipkorn, R., & Wang, Y. (2008). Yeast and human Ysl2p/hMon2 interact with Gga adaptors and mediate their subcellular distribution. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.75>
- Sinha, D., Ivan, D., Gibbs, E., Chetluru, M., Goss, J., & Chen, Q. (2022). Fission yeast polycystin Pkd2p promotes cell size expansion and antagonizes the Hippo-related SIN pathway. *Journal of Cell Science*, 135(4). <https://doi.org/10.1242/jcs.259046>
- Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biology*, 1(2), reviews1011.1. <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-2-reviews1011>
- Soto, T., Núñez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., & Cansado, J. (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*, 153(5), 1519–1529. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/004283-0>
- Soto, T., Villar-Tajadura, M. A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., & Cansado, J. (2010). Rga4 Modulates the Activity of the Fission Yeast Cell Integrity MAPK Pathway by Acting as a Rho2 GTPase-activating Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11516–11525. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.071027>
- Stahelin, R. V., Long, F., Diraviyam, K., Bruzik, K. S., Murray, D., & Cho, W. (2002). Phosphatidylinositol 3-Phosphate Induces the Membrane Penetration of the FYVE Domains of Vps27p and Hrs. *Journal of Biological Chemistry*, 277(29), 26379–26388. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201106200>
- Starr, T. L., Pagant, S., Wang, C.-W., & Schekman, R. (2012). Sorting Signals That Mediate Traffic of Chitin Synthase III between the TGN/Endosomes and to the Plasma Membrane in Yeast. *PLoS ONE*, 7(10), e46386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046386>
- Stefan, C. J., Manford, A. G., Baird, D., Yamada-Hanff, J., Mao, Y., & Emr, S. D. (2011). Osh proteins regulate phosphoinositide metabolism at ER-plasma membrane contact sites. *Cell*, 144(3), 389–401. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.034>

- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O., & Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*, 424(6951), 961–965. <https://doi.org/10.1038/nature01907>
- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H., Kuno, T., & Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*, 399(6735), 479–483. <https://doi.org/10.1038/20951>
- Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., & Kuno, T. (1998). pmp1, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. In *The EMBO Journal* (Vol. 17, Issue 1).
- Suh, B. C., & Hille, B. (2005). Regulation of ion channels by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 15, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 370–378). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2005.05.005>
- Sunshine, H., & Iruela-Arispe, M. L. (2017). Membrane lipids and cell signaling. *Current Opinion in Lipidology*, 28(5), 408–413. <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000443>
- Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K., & Sugiura, R. (2010). The Cell Surface Protein Gene ecm33 Is a Target of the Two Transcription Factors Atf1 and Mbx1 and Negatively Regulates Pmk1 MAPK Cell Integrity Signaling in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 21, 674–685. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09>
- Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T., & Sugiura, R. (2007). Atf1 Is a Target of the Mitogen-activated Protein Kinase Pmk1 and Regulates Cell Integrity in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 4794–4802. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-03-0282>
- Tan, J. Z. A., & Gleeson, P. A. (2019). Cargo sorting at the trans-golgi network for shunting into specific transport routes: Role of arf small g proteins and adaptor complexes. In *Cells* (Vol. 8, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8060531>
- Tarassov, K., Messier, V., Landry, C. R., Radinovic, S., Molina, M. M. S., Shames, I., Malitskaya, Y., Vogel, J., Bussey, H., & Michnick, S. W. (2008). An in Vivo Map of the Yeast Protein Interactome. *Science*, 320(5882), 1465–1470. <https://doi.org/10.1126/science.1153878>
- Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C. T., & Shiozaki, K. (2010). Rab-Family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Current Biology*, 20(22), 1975–1982. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.10.026>
- Theos, A. C., Tenza, D., Martina, J. A., Hurbain, I., Peden, A. A., Sviderskaya, E. V., Stewart, A., Robinson, M. S., Bennett, D. C., Cutler, D. F., Bonifacino, J. S., Marks, M. S., & Raposo, G. (2005). Functions of adaptor protein (AP)-3 and AP-1 in tyrosinase sorting from endosomes to melanosomes. *Molecular Biology of the Cell*, 16(11), 5356–5372. <https://doi.org/10.1091/mbc.E05-07-0626>

- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R., & Kuno, T. (1996). The Fission Yeast *pmk1* + Gene Encodes a Novel Mitogen-Activated Protein Kinase Homolog Which Regulates Cell Integrity and Functions Coordinately with the Protein Kinase C Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, 16(12), 6752–6764. <https://doi.org/10.1128/MCB.16.12.6752>
- Toda, T., Shimanuki, M., & Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *The EMBO Journal*, 12(5), 1987–1995. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05848.x>
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., & Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO Journal*, 25(5), 943–954. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601007>
- Tzeng, H.-T., & Wang, Y.-C. (2016). Rab-mediated vesicle trafficking in cancer. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), 70. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0287-7>
- Uemura, T., Kametaka, S., & Waguri, S. (2018). GGA2 interacts with EGFR cytoplasmic domain to stabilize the receptor expression and promote cell growth. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19542-4>
- Uemura, T., & Waguri, S. (2020). Emerging roles of Golgi/endosome-localizing monomeric clathrin adaptors GGAs. In *Anatomical Science International* (Vol. 95, Issue 1, pp. 12–21). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12565-019-00505-2>
- Ungewickell, E., & Branton, D. (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289(5796), 420–422. <https://doi.org/10.1038/289420a0>
- Valdez-Taubas, J., & Pelham, H. R. B. (2003). Slow Diffusion of Proteins in the Yeast Plasma Membrane Allows Polarity to Be Maintained by Endocytic Cycling. *Current Biology*, 13, 1636–1640. <https://doi.org/10.1016/j>
- Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S., & Schekman, R. W. (2002). The Yeast Clathrin Adaptor Protein Complex 1 Is Required for the Efficient Retention of a Subset of Late Golgi Membrane Proteins. *Developmental Cell*, 2(3), 283–294. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00127-2)
- Van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: Where they are and how they behave. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 9, Issue 2, pp. 112–124). <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vázquez, B., Soto, T., del Dedo, J. E., Franco, A., Vicente, J., Hidalgo, E., Gacto, M., Cansado, J., & Madrid, M. (2015). Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cellular Signalling*, 27(12), 2534–2542. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.09.017>
- Viana, R. A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P. M., Cansado, J., & Pérez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics*, 195(2), 421–432. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.154807>

- Vicente-soler, J., Soto, T., Franco, A., Cansado, J., & Madrid, M. (2021). The multiple functions of rho gtpases in fission yeasts. In *Cells* (Vol. 10, Issue 6). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10061422>
- Villar-Tajadura, M. A., Coll, P. M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B., & Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular Microbiology*, 70(4), 867–881. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06447.x>
- Vjestica, A., Zhang, D., Liu, J., & Oliferenko, S. (2013). Hsp70-Hsp40 Chaperone Complex Functions in Controlling Polarized Growth by Repressing Hsf1-Driven Heat Stress-Associated Transcription. *PLoS Genetics*, 9(10), e1003886. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003886>
- Vo, T. V., Das, J., Meyer, M. J., Cordero, N. A., Akturk, N., Wei, X., Fair, B. J., Degatano, A. G., Fragoza, R., Liu, L. G., Matsuyama, A., Trickey, M., Horibata, S., Grimson, A., Yamano, H., Yoshida, M., Roth, F. P., Pleiss, J. A., Xia, Y., & Yu, H. (2016). A Proteome-wide Fission Yeast Interactome Reveals Network Evolution Principles from Yeasts to Human. *Cell*, 164(1–2), 310–323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.037>
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *Journal of Cell Biology*, 174(7), 973–983. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605106>
- Wang, X., Huang, T., Bu, G., & Xu, H. (2014). Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration. *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-31>
- Wang, Y. J., Wang, J., Sun, H. Q., Martinez, M., Sun, Y. X., Macia, E., Kirchhausen, T., Albanesi, J. P., Roth, M. G., & Yin, H. L. (2003). Phosphatidylinositol 4 Phosphate Regulates Targeting of Clathrin Adaptor AP-1 Complexes to the Golgi. *Cell*, 114(3), 299–310. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00603-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00603-2)
- Weisman, R., & Choder, M. (2001). The Fission Yeast TOR Homolog, tor1+, is Required for the Response to Starvation and other Stresses via a Conserved Serine. *Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 7027–7032. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200>
- Weisman, R., Roitburg, I., Schonbrun, M., Harari, R., & Kupiec, M. (2007). Opposite Effects of Tor1 and Tor2 on Nitrogen Starvation Responses in Fission Yeast. *Genetics*, 175(3), 1153–1162. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.064170>
- Whitley, P., Reaves, B. J., Hashimoto, M., Riley, A. M., Potter, B. V. L., & Holman, G. D. (2003). Identification of Mammalian Vps24p as an Effector of Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate-dependent Endosome Compartmentalization. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38786–38795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306864200>
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B., & Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & Development*, 10(18), 2289–2301. <https://doi.org/10.1101/gad.10.18.2289>

- Willet, A. H., Turner, L. A., Park, J. S., Ren, L., Snider, C. E., & Gould, K. L. (n.d.). *Characterization of Pik1 function in fission yeast reveals its conserved role in lipid synthesis and not cytokinesis*. <https://doi.org/10.1101/2023.07.24.550375>
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.-A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., ... Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, 415(6874), 871–880. <https://doi.org/10.1038/nature724>
- Wood, V., Harris, M. A., McDowall, M. D., Rutherford, K., Vaughan, B. W., Staines, D. M., Aslett, M., Lock, A., Bähler, J., Kersey, P. J., & Oliver, S. G. (2012). PomBase: A comprehensive online resource for fission yeast. *Nucleic Acids Research*, 40(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkr853>
- Yanguas, F., Moscoso-Romero, E., & Valdivieso, M. H. (2019). Ent3 and GGA adaptors facilitate diverse anterograde and retrograde trafficking events to and from the prevacuolar endosome. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47035-5>
- Yenush, L. (2016). Potassium and sodium transport in yeast. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 892, pp. 187–228). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25304-6_8
- Yeung, B. G., & Payne, G. S. (2001). Clathrin Interactions with C-Terminal Regions of the Yeast AP-1 β and γ Subunits are Important for AP-1 Association with Clathrin Coats. *Traffic*, 2(8), 565–576. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.20806.x>
- Yeung, B. G., Phan, H. L., & Payne, G. S. (1999). Adaptor Complex-independent Clathrin Function in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 10(11), 3643–3659. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3643>
- Yeung, T., Gilbert, G. E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A., & Grinstein, S. (n.d.). *Membrane Phosphatidylserine Regulates Surface Charge and Protein Localization*. <https://www.science.org>
- Yoshida, T., Toda, T., & Yanagida, M. (1994). A calcineurin-like gene *ppb1* + in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *Journal of Cell Science*, 107(7), 1725–1735. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.7.1725>
- Yu, J. W., & Lemmon, M. A. (2001). All Phox Homology (PX) Domains from *Saccharomyces cerevisiae* Specifically Recognize Phosphatidylinositol 3-Phosphate. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47), 44179–44184. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108811200>
- Yu, Y., Kita, A., Udo, M., Katayama, Y., Shintani, M., Park, K., Hagihara, K., Umeda, N., & Sugiura, R. (2012). Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, Is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS ONE*, 7(9), e45324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045324>
- Yu, Y., Li, C., Kita, A., Katayama, Y., Kubouchi, K., Udo, M., Imanaka, Y., Ueda, S., Masuko, T., & Sugiura, R. (2013). Sip1, an AP-1 Accessory Protein in Fission Yeast, Is Required for Localization of Rho3 GTPase. *PLoS ONE*, 8(7), e68488. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068488>

- Zaitsevskaya-Carter, T. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *The EMBO Journal*, 16(6), 1318–1331. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.6.1318>
- Zhang, M., Ma, Y., Ye, X., Zhang, N., Pan, L., & Wang, B. (2023). TRP (transient receptor potential) ion channel family: structures, biological functions and therapeutic interventions for diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 8, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01464-x>
- Zhang, Y., Sugiura, R., Lu, Y., Asami, M., Maeda, T., Itoh, T., Takenawa, T., Shuntoh, H., & Kuno, T. (2000). Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 275(45), 35600–35606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005575200>
- Zhang, Z., Kulkarni, K., Hanrahan, S. J., Thompson, A. J., & Barford, D. (2010). The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *The EMBO Journal*, 29(21), 3733–3744. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.247>
- Zhdankina, O., Strand, N. L., Redmond, J. M., & Boman, A. L. (2001). Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast*, 18(1), 1–18. [https://doi.org/10.1002/1097-0061\(200101\)18:1<1::AID-YEA644>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-0061(200101)18:1<1::AID-YEA644>3.0.CO;2-5)
- Zhou 1990. (n.d.).
- Zhou, X. , Y. Ma, R., Sugiura, D., Kobayashi, M. Suzuki, L. Deng, & T. Kuno. (2010). MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)-dependent and -independent activation of Sty1 stress MAPK in fission yeast. *J Biol Chem*, 285, 32818–32823.
- Zimmermann, J., Chidambaram, S., & Fischer von Mollard, G. (2010). Dissecting Ent3p: the ENTH domain binds different SNAREs via distinct amino acid residues while the C-terminus is sufficient for retrograde transport from endosomes. *Biochemical Journal*, 431(1), 123–134. <https://doi.org/10.1042/BJ20100693>
- Zimmermannová, O., Felcmanová, K., Rosas-Santiago, P., Papoušková, K., Pantoja, O., & Sychrová, H. (2019). Erv14 cargo receptor participates in regulation of plasma-membrane potential, intracellular pH and potassium homeostasis via its interaction with K⁺-specific transporters Trk1 and Tok1. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(9), 1376–1388. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.05.005>