



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO FUNCIONAL Y
EVOLUTIVO DEL COMPLEJO
DEL EXÓMERO EN HONGOS**



*Carlos Antón Nájaro
Salamanca, 2018*



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética

INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA
(centro mixto USAL/CSIC)

ESTUDIO FUNCIONAL Y EVOLUTIVO DEL COMPLEJO DEL EXÓMERO EN HONGOS

Tesis Doctoral

Carlos Antón Plágaro

Salamanca, 2018



EL DR. FRANCISCO DEL REY IGLESIAS, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y COORDINADOR DEL PROGRAMA DE DOCTORADO BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada 'Estudio funcional y evolutivo del complejo del exómero en hongos', presentada por el licenciado Carlos Antón Plágaro para optar al grado de Doctor en Biología ('Mención Internacional') por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. César Roncero Maíllo, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 2018.

Fdo. Francisco del Rey Iglesias



EL DR. CÉSAR RONCERO MAÍLLO, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada 'Estudio funcional y evolutivo del complejo del exómero en hongos', presentada por el licenciado Carlos Antón Plágaro para optar al grado de Doctor en Biología ('Mención Internacional') por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 2018.

Fdo. César Roncero Maíllo

AGRADECIMIENTOS

Avanzada ya la escritura del presente manuscrito, me percaté de la necesidad de dejar libre un espacio para escribir los agradecimientos, pues eso es lo que se suele hacer. La verdad es que se me hizo difícil encontrar un hueco para sentarme y poder discernir entre que cosas uno debiera agradecer y las que realmente quiere agradecer. Y es que, aunque muchos son los nombres que uno recuerda, la verdad es que uno se da cuenta de que a muchas personas hay que agradecerles cosas puntuales, pero solo a unas pocas hay que agradecerles su continua presencia en este largo camino de fuerte desnivel, que en definitiva, ha sido y será una etapa que sin duda dejará huella en lo que uno quiere ser y lo que será.

Como el lector probablemente sabrá, la expresión literaria no es mi fuerte, y jamás seré capaz de describir tan acertadamente lo que uno siente a lo largo de esta etapa como acertadamente consiguió 'Atenea en la búsqueda de sus perlas'. Ahora bien, tampoco quisiera abandonar la oportunidad de escribir unas pocas palabras de AGRADECIMIENTO porque, aunque los agradecidos bien debieran de saberlo, a veces conviene expresarlo.

Aunque la familia, amigos y otros compañeros de camino naturalmente me han permitido llegar hasta aquí, sin duda las letras mayúsculas van principalmente dirigidas a las amistades desinteresadas que me ha proporcionado esta tesis, y por supuesto a ELLA.

Personalmente, esta etapa de tesis doctoral ha supuesto una fuerte transición. Sin embargo, no quisiera dejar de dar las gracias a las amistades con las que contaba al inicio de este periplo, pues en algún momento fueron mi mayor sustento, así como aquellas con las que aún hoy puedo contar de aquella etapa. Y es que sin duda alguna, las relaciones y las amistades es lo más significativo que 'Salamanca a uno presta'.

Indudablemente la transición fue dura, pero fue lo que posibilitó conocer a la persona a la que sin duda alguna le debo gran parte de esta tesis. Sin entrar en lo personal, en lo que respecta a este trabajo quiero agradecer tu consejo así como tus críticas, y tu apoyo y más sincera confianza hacia mí y mi trabajo. Gracias por el interés mostrado ante temas y divagaciones que rozan el absurdo. Gracias por aguantar mi interés, a veces absorbente, por el entendimiento de lo más básico e insignificante para muchos. Y principalmente, gracias por decidir caminar junto a mí este camino lleno de incertidumbres que, aunque a priori se muestre algo escabroso, constituye una parte innegable de lo que soy. GRACIAS, Eli.

Dentro de la 'Caja Roja' quisiera dar las gracias a todos aquellos integrantes del grupo 'Café de Pared', desde los que me introdujeron en este grupo tan 'selecto', hasta los que fueron incorporándose durante mi estancia en el instituto. También me gustaría agradecer las horas de ocio compartidas con aquellos nuevos reclutas, muchos de los cuales hoy en día siguen siendo buenos amigos. También a mi director de tesis, que a pesar de su bien sabida ausencia de filtros, fue capaz de enderezar mi tropezoso andar y motivar mi faceta autodidacta para convertirme en un mejor científico. Así como a todos los integrantes del grupo de los 'CRM', y en especial a Irene y Charo, con las que he compartido tantos momentos de poyata. No quisiera olvidarme de otras personas del instituto con las que pasé buenos momentos dentro y fuera de él, tanto investigadores como personal de apoyo. Pero sobretodo, quisiera enviar mi más sincera gratitud a las amigas, por no decir hermanas, que tan agradecido me llevo de esta tesis, y cuyo consejo, sea científico o no, fue, es y será tremendamente valioso.

Fuera del instituto, en primer lugar quiero agradecer a mi familia, porque aun sin entender que es lo que estaba haciendo en Salamanca, aparte de 'cobrar', me apoyaron en mi empeño de hacer el doctorado, y porque sé que pase lo que pase siempre estarán ahí. También, a los amigos que aún conservo de la carrera y de Burgos. Y por supuesto a 'La bigoteh', tanto por su perseverancia en su andadura personal que me ha servido de modelo, como por los buenos ratos compartidos juntos.

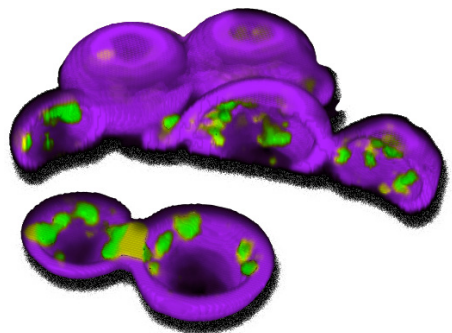
Finalmente, desde el lado profesional, quisiera agradecer a las instituciones que han permitido mi formación investigadora dentro y fuera de España. Principalmente a la Universidad de Salamanca por la beca para el contrato pre-doctoral cofinanciada por el Banco Santander, y a EMBO por la beca 'EMBO Short-Term Fellowship' para mi estancia en Michigan (USA). Además, quisiera agradecer a las Profesoras Anne Spang y Mara Duncan por su importante aval, así como por sus consejos y críticas en el desarrollo de esta tesis.

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

aa	Aminoácido / amino acid
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucleico / desoxirribonucleic acid
ALP	Fosfatasa Alcalina / <i>Alkaline Phosphatase</i>
ANTH	<i>AP180 N-terminal homology domain</i>
AP	Polipéptido de ensamblaje / <i>Assembly polypeptide</i>
ARF	Factor de ADP-ribosilación / <i>ADP-ribosylation factor</i>
ATP	Adenosín tri-fosfato
ADP	Adenosín di-fosfato
BAR	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs-homology</i>
BSA	Albúmina sérica bovina / <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCV	Vesículas cubiertas por clatrina / <i>Clathrin-Coated Vesicles</i>
ChAP	Proteínas de unión a Chs5 y Arf1 / <i>Chs5 and Arf1 binding proteins</i>
CME	Endocitosis mediada por clatrina / <i>Clathrin Mediated Endocytosis</i>
CPS	Carboxipeptidasa S
CPY	Carboxipeptidasa Y
CWI	Ruta de integridad celular (<i>Cell Wall Integrity Pathway</i>)
CWP	Proteína de la pared celular / <i>Cell Wall Protein</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
ENTH	<i>Epsin N-terminal homology domain</i>
ERAD	Degradación asociada al RE (<i>Endoplasmic-reticulum-associated degradation</i>)
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
EE	Endosoma temprano / <i>Early Endosome</i>
ERES	Sitios de salida del Retículo Endoplásmico / <i>ER Exit Sites</i>
ERGIC	Compartimento intermedio RE-Golgi / <i>ER-Golgi Intermediate Compartment</i>
GAAC	Control general por aminoácidos / <i>General Amino Acid Control</i>
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica / <i>GTPase Activating Protein</i>
GDI	Inhibidor de la disociación del nucleótido de guanosina / <i>Guanosine nucleotide Dissociation inhibitor</i>
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina / <i>Guanine Exchange Factor</i>
GFP	Proteína verde fluorescente / <i>Green Fluorescent Protein</i>
GGA	<i>Golgi-localized γ-adaptin ear homology Arf-binding proteins</i>
GPCR	Receptor acoplado a proteína G heterotrimérica / <i>G protein-coupled receptors</i>
GPI	Glucosil fosfatidil Inositol
GTP	Guanosin tri-fosfato
GDP	Guanosin di-fosfato
HA	Epítipo inmunorreactivo procedente de la hemaglutinina del virus de la gripe / <i>Human influenza hemagglutinine pitope</i>
ILV	Vesículas intralunimales (<i>Intraluminal Vesicles</i>)
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
LatA	Latrunculina A
LB	Medio rico para <i>E. coli</i> / <i>Luria-Bertani media</i>
LECA	Último ancestro eucariota común / <i>Last Eukaryotic Common Ancestor</i>
MAP	Proteína activada por mitógeno / <i>Mitogen Activated Protein</i>
MP/PM	Membrana Plasmática / <i>plasma membrane</i>

mRuby2	Monomeric Ruby2 protein fluorescent
MVB	Cuerpo multivesicular / <i>Multivesicular Body</i>
NCR	Represión por Catabolito del Nitrógeno / <i>Nitrogen Catabolite Represion</i>
PC	Pared Celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa / <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIP	Fosfatidil Inositol fosfato
PI2P	Fosfatidil inositol 2-fosfato
PI3P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PI4P	Fosfatidil inositol 4-fosfato
PI2P	Fosfatidil inositol 5-fosfato
PI3,5P₂	Fosfatidil inositol 3,5-bisfosfato
PI4,5P₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PVC	Compartimento prevacuolar / <i>Prevacuolar Compartment</i>
QS/CS	Quitín Sintasa / <i>Chitin Synthase</i>
RE/ER	Retículo Endoplasmático / <i>Endoplasmic reticulum</i>
RFP	Proteína roja fluorescente / <i>Red Fluorescent Protein</i>
SD	Medio sintético definido
SDc	Medio sintético definido completo
SDS	Docecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNX	<i>Sorting Nexin</i>
SP	Septo Primario
SPS	Sensor compuesto por Ssy1, Ptr3 y Ssy5 / <i>Ssy1, Ptr3 and Ssy5 complex sensor</i>
SS	Septo Secundario
SH3	Domino 3 homólogo a SRC / <i>SRC homology 3 Domain</i>
TORC1	Complejo Diana de la Rapamicina 1 / <i>Target of Rapamycin Complex I</i>
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red de Trans Golgi / <i>Trans-Golgi Network</i>
TMD	Dominio transmembrana / <i>Transmembrane Domain</i>
TPR	Repetición Tetratricopéptido / <i>Tetratricopeptide Repetition</i>
Ub	Ubiquitina
WGD	Duplicación completa del genoma / <i>Whole Genome Duplication</i>
WT	Estirpe silvestre / <i>Wild type</i>
YEPD	Medio de crecimiento rico / <u>Y</u> east <u>E</u> xtract, <u>P</u> eptone, <u>D</u> extrose
YES	Medio de crecimiento rico / <u>Y</u> east <u>E</u> xtract, <u>D</u> extrose, aa supplements
YNb	Yeast Nitrogen base

ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS.....	3
1.1. Importancia del tráfico intracelular de proteínas.....	3
1.2. Introducción a las especies fúngicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis.....	3
1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , modelo contrastado para el estudio del tráfico intracelular.....	4
2. MORFOGÉNESIS Y POLARIZACIÓN CELULAR.....	6
2.1. Procesos morfogénéticos.....	6
2.2. Morfogénesis y polarización en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3. INTERACCIÓN CON EL MEDIO: LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA PARED CELULAR.....	10
3.1. Relevancia biológica.....	11
3.2. Pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	11
3.3. Transporte trans-membranal.....	11
4. TRANSPORTE INTRACELULAR DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA.....	12
4.1. Transporte entre compartimentos celulares.....	12
4.2. Proceso de vesiculación.....	13
4.3. Las proteínas con dominios transmembrana: el cargo del tráfico intracelular.....	15
4.4. Panorámica de las rutas de transporte intracelular.....	16
4.5. Homeostasis de la membrana plasmática: secreción y endocitosis regulada.....	19
4.5.1. Salida del TGN hacia la MP: exocitosis.....	19
4.5.2. Organización de la membrana plasmática.....	21
4.5.3. Endocitosis.....	23
4.5.4. Control de calidad y reciclado.....	25
4.5.5. Complejos adaptadores del tráfico intracelular en el TGN/EE.....	27
i. Cubierta de clatrina.....	27
ii. Complejos proteicos adaptadores AP.....	28
iii. Otros complejos adaptadores.....	30
iv. GGAs (Golgi-localized, Gamma-ear containing, Arf-binding proteins): Gga1 y Gga2.....	30
v. Epsinas en el TGN/EE: Ent3 y Ent5.....	31
vi. Coordinación entre adaptadores.....	32
5. EL EXÓMERO.....	33
i. Antecedentes.....	33
ii. Un complejo proteico asociado a las membranas del TGN/EE.....	33
iii. Los cargos del exómero.....	35
iv. Otras funciones y conservación del exómero.....	36
6. FISIOLÓGÍA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.....	37
6.1. Transporte de iones en la membrana plasmática.....	37
6.2. Respuesta al estrés catiónico y la ruta RIM101.....	39
6.3. La membrana plasmática y el metabolismo de aminoácidos.....	41
II. METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
1. CAPÍTULO 1: Implicaciones del exómero en el metabolismo catiónico.....	49
Resumen.....	50

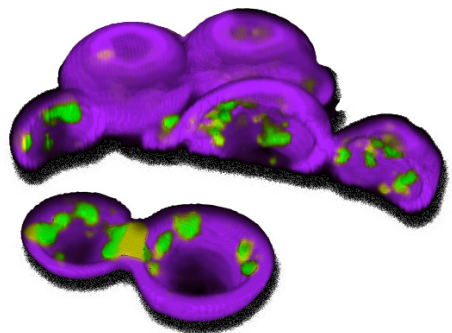
Artículo: Anton et al., 2017.....	53
2. CAPÍTULO 2: El exómero en perspectiva evolutiva.....	67
Resumen.....	68
Artículo: Anton et al., 2018.....	72
Artículo: Ramirez-Macias et al., en revisión.....	88
3. CAPÍTULO 3: EL exómero en el metabolismo del nitrógeno.....	103
3.1. Antecedentes.....	104
3.2. El mutante del exómero <i>chs5Δ</i> es hipersensible al catión amonio.....	104
3.3. La sensibilidad de los mutantes del exómero al amonio está ligada al metabolismo del triptófano.....	106
3.4. El exómero participa en el metabolismo de aminoácidos.....	108
3.5. El papel del exómero en el tráfico intracelular de las permeasas de aminoácidos.....	110
3.6. El exómero y la sensibilidad a rapamicina.....	114
Tablas del capítulo 3.....	115
III. DISCUSIÓN GENERAL.....	119
1. EL EXÓMERO: UN COMPLEJO PROTEICO ASOCIADO A LAS MEMBRANAS DEL COMPARTIMENTO TGN/EE.....	121
2. FUNCIONES DESCRITAS PARA EL EXÓMERO.....	122
2.1. Transporte de los cargos <i>bona fide</i> : ¿proteínas únicas de <i>Saccharomyces</i> ?.....	122
2.2. Asistencia al transporte de otros cargos polarizados.....	124
2.3. Otras funciones del exómero en el compartimento TGN/EE.....	125
3. EL EXÓMERO Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS.....	126
4. EL EXÓMERO, UN COMPLEJO PROTEICO EVOLUTIVAMENTE CONSERVADO QUE HA SUFRIDO NEOFUNCIONALIZACIÓN.....	127
5. LA FUNCIÓN ANCESTRAL DEL EXÓMERO.....	130
IV. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	133
V. SUMMARY (RESUMEN EN INGLÉS).....	137
1. INTRODUCTION.....	139
2. RESULTS AND DISCUSSION.....	142
2.1. Chapter 1: Exomer complex implications in the cationic metabolism.....	142
i. Ena1 polarized transport depends on functional exomer complex.....	143
ii. The assembly of RIM101 pathway sensor depends on exomer complex.....	144
2.2. Chapter 2: The exomer complex in evolutionary context.....	146
i. Specialization of exomer complex as cargo adaptor in <i>Saccharomycotina</i> clade.....	147
ii. Evolutionary origin, distribution and conservation of exomer complex	149
2.3. Chapter 3: Exomer complex implications in the nitrogen metabolism.....	151
i. The <i>chs5Δ</i> ammonium sensitivity is linked to tryptophan availability.....	151
ii. A role for exomer complex in the transport of amino acid permeases.....	152
3. GENERAL DISCUSSION.....	153
VI. BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES.....	157
VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO/SUPPLEMENTAL MATERIAL (versión digital/digital version)...	173
1. Anton et al., 2017.....	175

2. Anton et al., 2018.....	179
3. Ramirez-Macias., en revisión.....	187

ÍNDICE DE FIGURAS:

FIG. 1.....	5	FIG. C1.1.....	52
FIG. 2.....	8	FIG. C3.1.....	105
FIG. 3.....	9	FIG. C3.2.....	105
FIG. 4.....	11	FIG. C3.3.....	109
FIG. 5.....	14	FIG. C3.4.....	111
FIG. 6.....	17	FIG. C3.5.....	113
FIG. 7.....	20	FIG. C3.6.....	115
FIG. 8.....	22	FIG. I.....	140
FIG. 9.....	24	FIG. II.....	141
FIG. 10.....	26	FIG. III.....	144
FIG. 11.....	27	FIG. IV.....	145
FIG. 12.....	39	FIG. V.....	147
FIG. 13.....	35	FIG. VI.....	148
FIG. 14.....	38	FIG. VII.....	150
FIG. 15.....	41	FIG. VIII.....	152
FIG. 16.....	43		

INTRODUCCIÓN



1. LAS LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

1.1. Importancia del tráfico intracelular de proteínas

En contra de la corriente actual que aboga cada vez más por el mercantilismo en el estudio científico, no está de más recordar que el querer indagar en lo desconocido, sin pensar en posibles retribuciones directas para la sociedad, es la verdadera clave del origen del desarrollo tecnológico actual. Pero si aun así, dicha razón no le es suficiente al lector, cabe destacar que el entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares del tráfico intracelular de proteínas es clave para conocer las causas de numerosas enfermedades humanas, así como para desarrollar posibles terapias.

Numerosas enfermedades humanas tienen su origen en una o varias mutaciones puntuales en elementos que participan en el complejo tráfico intracelular. A modo de ejemplo, podemos mencionar que determinadas enfermedades neurodegenerativas se deben a perturbaciones en la endocitosis de ciertas proteínas, que alteraciones en la ruta secretora de proteínas están detrás del desarrollo de desórdenes neuromusculares, o que la mucopolisidosis II tiene su origen en el mal funcionamiento de compartimentos pre-lisosomales. Por otro lado, muchos agentes patógenos han desarrollado mecanismos para crecer y reproducirse valiéndose de la maquinaria del tráfico intracelular del hospedador. Por lo tanto, un incremento del conocimiento en dicho campo permitiría el desarrollo de nuevas vías de actuación frente a dichas enfermedades (Kim and Gadila, 2016; Howell et al., 2006). Si se tiene en cuenta que más del 25% por ciento de los genes causantes de enfermedades humanas presentan una proteína homóloga en las especies de levaduras, estos organismos constituyen un buen modelo donde analizar los mecanismos moleculares que se encuentran afectados en dichas enfermedades (Bassett et al., 1996). En este sentido, estudios moleculares utilizando la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* han permitido la identificación de muchos de los efectores y complejos proteicos implicados en las rutas de tráfico intracelular eucariota, muchos de ellos conservados a lo largo del dominio eucariota. Por lo tanto, debido a la conservación de los actores en este proceso entre levaduras y eucariotas superiores, estos organismos suponen una excelente herramienta para entender los procesos que tienen lugar en células de organismos superiores, sea en condiciones estándar o en situaciones patogénicas.

1.2. Introducción a las especies fúngicas utilizadas en el desarrollo de esta tesis

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, y con el fin de dilucidar el papel conservado del complejo del exómero en el transporte intracelular de proteínas, se decidió utilizar diferentes organismos modelo que presentan genes con homología para las diferentes subunidades del exómero, todos ellos representantes del clado fúngico. Para la selección de estos organismos nos basamos fundamentalmente en criterios evolutivos que explicaremos más adelante, así como en su disponibilidad, requerimientos de contención biológica y actual desarrollo de sus técnicas de biología molecular.

Saccharomyces cerevisiae: Este organismo, modelo clásico de la célula eucariota, ha constituido el marco principal para el desarrollo de esta tesis. Sus características más relevantes serán desarrolladas posteriormente.

Kluyveromyces lactis: Al igual que *S. cerevisiae*, es un representante de las levaduras de gemación. Filogenéticamente, esta especie se sitúa dentro del Phylum Ascomycetes, SubPhylum Saccharomycotina, familia Saccharomycetaceae, clado 'KLE', género *Kluyveromyces*. De este modo, podemos decir que es un organismo 'próximo' a *S. cerevisiae*, y cuya línea evolutiva divergió poco antes de la duplicación del genoma, característica del clado 'post-WGD' (del inglés duplicación completa del genoma), al cual pertenece la otra levadura mencionada (Dujon and Louis, 2017). Fue aislado de la leche y constituye el eucariota predominante durante la producción de queso. Se divide por gemación polar, presenta una morfología similar a *S. cerevisiae* pero muestra un volumen inferior y las cepas de laboratorio presentan un ciclo celular con fases haploide y diploide bastante estables. Además de ser un emergente organismo modelo, fundamentalmente por presentar menor redundancia génica que el propio *S. cerevisiae*, constituye una importante herramienta biotecnológica en la industria alimentaria, principalmente porque produce la enzima β -galactosidasa (enzima encargada de metabolizar la lactosa), y porque se usa como vehículo para la expresión heteróloga de multitud de proteínas (Rodicio and Heinisch, 2013) (**Figura 1**).

Candida albicans: Levadura con múltiples estadios morfológicos, levadura-hifa-pseudohifa, perteneciente al Phylum Ascomycetes, SubPhylum Saccharomycotina, clado 'CTG', agrupación Debaryomycetaceae, género *Candida* (Dujon and Louis, 2017) (**Figura 1**). Es un microorganismo oportunista adaptado a vivir en las mucosas de animales de sangre caliente. Su evolución como organismo comensal le ha permitido desarrollar sistemas que le permiten adaptarse rápidamente a condiciones adversas como cambios de temperatura, presión de oxígeno y dióxido de carbono. Un ejemplo de su capacidad adaptativa son las continuas transiciones morfológicas entre levadura, hifa y pseudohifa (Biswas et al., 2007). En condiciones normales forma parte de la microbiota humana, principalmente en las mucosas gastrointestinal y genitourinaria. Su infección es conocida como candidiasis, donde se ven afectadas las células epiteliales aunque en determinadas ocasiones puede generar infecciones sistémicas o candidemias, que pueden alcanzar una mortalidad del 30% (McCarty and Pappas, 2016).

Ustilago maydis: Hongo dimórfico causante de la enfermedad de la planta del maíz conocida como 'carbón del maíz'. Este hongo pertenece al Phylum Basidiomycetes, SubPhylum Ustilaginomycotina, y el resto de rangos llevan el nombre del género, *Ustilago* (Choi and Kim, 2017) (**Figura 1**). Posee un ciclo celular complejo con varias morfologías. Las células haploides son saprófitos que crecen como levaduras unicelulares alargadas que se dividen por gemación. La forma patogénica es un filamento dicarionte que se forma por fusión celular de dos levaduras de tipo sexual opuesto. Una vez detectadas determinadas señales provenientes de la planta, se diferencia en una estructura conocida como apresorio, la cual es capaz de penetrar en la hoja de la planta. Una vez dentro, prolifera formando una red de filamentos septados que inducirá la formación del tumor en la planta. Avanzada la enfermedad, se produce la fusión de núcleos que da lugar a la espora diploide. Esta, ya fuera del hospedador y dispersada por el viento, eventualmente germina y seguida de una meiosis dará lugar a cuatro células haploides que comenzarán de nuevo el ciclo (Pérez-Martín et al., 2006).

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*, modelo contrastado para el estudio del tráfico intracelular

Saccharomyces cerevisiae es un organismo unicelular eucariota perteneciente al Phylum Ascomycetes, SubPhylum Saccharomycotina, familia Saccharomycetaceae, clado 'post-WGD' (del

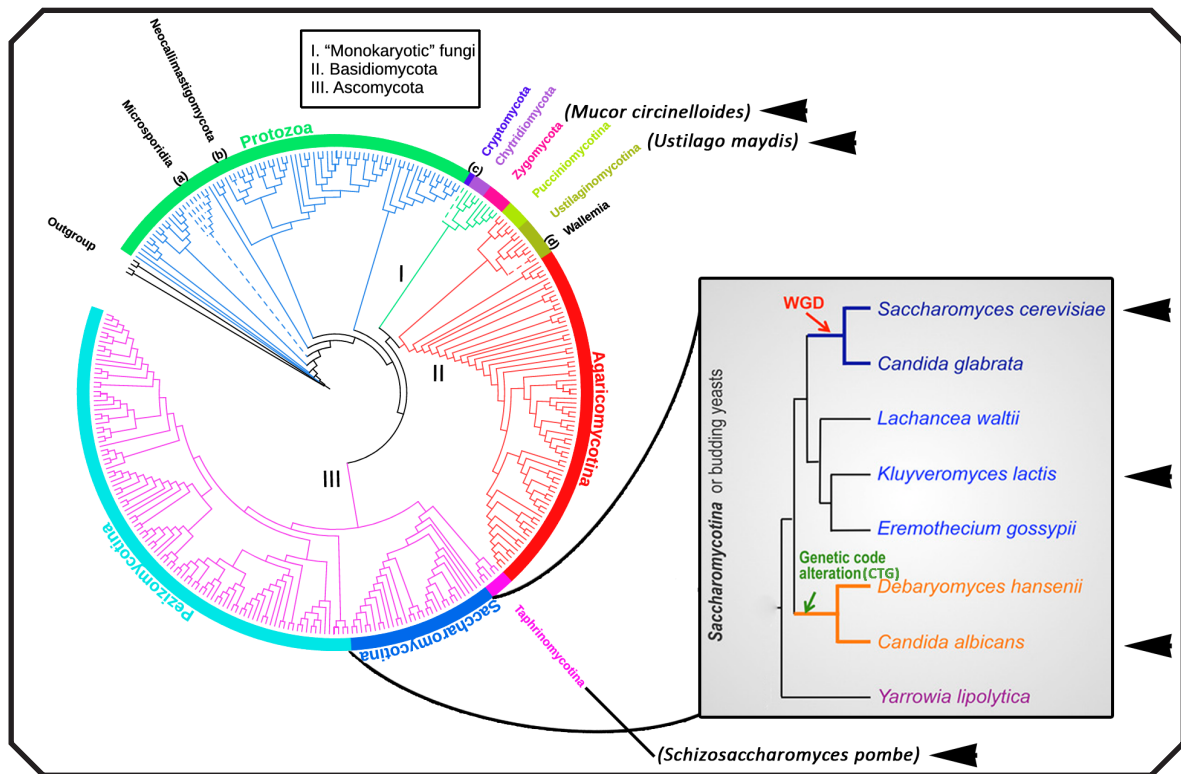


Figura 1. Distribución filogenética de las especies fúngicas utilizadas en la tesis. *Mucor circinelloides*, representante del clado basal Zygomycota (fucsia), dentro del grupo de los hongos monocarióticos (rama verde esmeralda). *Ustilago maydis*, representante del grupo Ustilaginomycotina (verde pistacho), dentro del clado Basidiomycota (rama roja). *Schizosaccharomyces pombe*, especie representante del grupo Taphrinomycotina (rosa), dentro del clado Ascomycota (rama rosa). Dentro del grupo Saccharomycotina (azul), a parte de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizaron *Kluyveromyces lactis* y *Candida albicans*. Nota: destacar el punto donde tuvo lugar la duplicación completa del genoma (WGD). Adaptado de Choi and Kim, 2017; Dujon and Louis, 2017.

inglés duplicación completa del genoma), género *Saccharomyces* (Dujon and Louis, 2017) **(Figura 1)**.

Este organismo presenta ciclo de vida haploide y diploide. En ambos ciclos, la célula se reproduce de forma asexual mediante gemación y división del material genético por mitosis. Las células haploides pueden ser de dos tipos sexuales diferentes (α y β). En determinadas condiciones, estas células secretan feromonas que son reconocidas por el tipo sexual opuesto, que mediante el proceso de conjugación darán lugar a la célula diploide. Al igual que la fase haploide, la diploide se reproduce asexualmente por gemación. En condiciones de estrés nutricional, la célula comienza el programa de esporulación que, tras un proceso meiótico, dará lugar a una estructura denominada asca; una cápsula contenedora de cuatro esporas haploides que podrán germinar, cerrándose de este modo el ciclo (Bardwell, 2005).

Comúnmente conocida como la levadura de la cerveza o del pan, esta especie ha acompañado a la industria alimentaria humana por muchos siglos. Además, presenta extraordinarias ventajas que le hacen ser uno de los organismos modelo eucariota más estudiado:

Estructura y fisiología conservada. Este organismo presenta grandes similitudes con las

células eucariotas superiores en multitud de rutas de señalización, tráfico entre compartimentos membranosos, metabolismo lipídico, etc.

Fácil manejo en el laboratorio. Desde hace más de un siglo se practica el aislamiento de cultivos puros de cepas de *S. cerevisiae*. Su corto tiempo de generación (90 min en medio rico), su facilidad para ser almacenado en glicerol a -80°C y su ausencia de patogenicidad, le hace ser un organismo ideal para su uso en investigación.

Sencillez y versatilidad genética. El gran desarrollo de su ingeniería genética junto con la experiencia de más de 25 años de trabajo en conocimiento de la secuencia completa de su genoma, le hace ser un organismo modelo indiscutible (Feyder et al., 2015).

Más concretamente, *S. cerevisiae* como modelo eucariota, ha sido determinante para identificar mecanismos y complejos imprescindibles en el tráfico intracelular de proteínas. Ejemplo de ello es la ruta secretora intracelular, que fue dilucidada en gran parte gracias al trabajo llevado a cabo en el laboratorio de Randy Schekman durante las décadas de 1980-90. Este hito le valió en 2013 compartir el premio Nobel en Fisiología y Medicina. Otro notorio galardonado fue Yoshinori Ohsumi, que consiguió el mismo premio en 2016 por dilucidar las bases del proceso celular de la autofagocitosis usando como organismo modelo la misma levadura. Así pues, multitud de estudios en *S. cerevisiae* han servido para identificar los eslabones de una compleja red de transporte intracelular que está mayoritariamente conservada en el dominio eucariota (Feyder et al., 2015; Harnett et al., 2017).

2. MORFOGÉNESIS Y POLARIZACIÓN CELULAR

2.1. Procesos morfogenéticos

Durante el ciclo de vida de un organismo, la/s células que lo conforman van a sufrir un cambio morfológico a múltiples niveles que tendrá como último fin la viabilidad de dicho ser. Este cambio en la distribución de los componentes presentes en las estructuras vivas, aplicado al entorno de una única célula, es lo que se entiende como morfogénesis celular. Así pues, en el contexto celular, una célula en un estadio concreto, ante una señal interna o externa, va a responder con un cambio en la distribución de sus componentes a lo largo de uno o varios ejes, lo cual se conoce como un cambio en la polaridad celular. Esta polaridad es necesaria para procesos tan importantes como la gametogénesis, función inmunológica, organogénesis, crecimiento axonal, comunicación celular, crecimiento hifal en múltiples patógenos o el desarrollo del tubo polínico (**Figura 2 A**).

Todo cambio en la polaridad celular requiere de una primera fase en la que se genera una momentánea polarización o rotura de la simetría celular, originada bien por una señal externa (como puede ser la recepción hormonal) o por un proceso espontáneo, una segunda fase de establecimiento del eje/ejes de polarización, y una tercera de mantenimiento de dicha polaridad. Estos procesos tienen en común la participación de GTPasas de la familia Ras, que junto a sus reguladores definirán los ejes de polarización en torno a los que se dirigirán el citoesqueleto y la secreción y endocitosis de componentes celulares. La hipótesis actual es que las rutas y los mecanismos generales de la polaridad celular están conservados a lo largo de la escala evolutiva eucariota (revisado en Bi and Park, 2012; Diepeveen et al., 2017; Mazel, 2017).

El establecimiento de este eje y su mantenimiento en el tiempo va a dar lugar a una polarización global de todos los componentes de la célula. En consonancia, están descritos múltiples ejemplos de polarización celular en los que se generan dominios lipídicos específicos. Por ejemplo, existe una distribución opuesta de los fosfoinosítidos PI2P y PI3P, lípidos importantes en señalización celular. Así, en células migrantes del sistema inmune, la membrana plasmática (MP) de la zona líder está enriquecida en PI3P, mientras que la zona posterior es rica en PI2P; y en células epiteliales la cara apical es rica en PI2P y la baso-lateral en PI3P. También se ha descrito una distribución asimétrica de los receptores, canales y transportadores. Tal es el caso de los transportadores de calcio, que se sitúan en la cara líder de las células migrantes y en la cara apical de las células epiteliales, así como los receptores de acetilcolina que junto con las bombas Na⁺-K⁺ se concentran en la membrana baso-lateral de los acinos pancreáticos. Del mismo modo, existe una polarización del citoesqueleto que dirigirá la localización de estos componentes así como la de los propios orgánulos celulares. Ejemplos de ello son las células migrantes que presentan el núcleo en la zona posterior, o la acumulación de mitocondrias en zonas celulares donde se requiere un alto gasto energético y el secuestro momentáneo de iones Ca⁺ como ocurre en las terminaciones nerviosas (revisado en Mazel, 2017).

2.2. Morfogénesis y polarización en *Saccharomyces cerevisiae*

A lo largo de los años, se han usado numerosos sistemas biológicos para intentar comprender los elementos moleculares de los procesos de morfogénesis y polarización celular, pero en pocos se ha llegado a tal nivel de detalle como en la levadura de gemación *S. cerevisiae*.

En esta levadura existen dos procesos de polarización celular muy bien descritos: citoquinesis asimétrica por gemación (**Figura 2 A**), y crecimiento polarizado durante la conjugación sexual. Ambos procesos comparten la mayoría de los componentes moleculares de polarización, pero se diferencian en el reconocimiento y establecimiento inicial de la asimetría celular. De este modo, una señal externa o una marca molecular del sitio donde tuvo lugar la anterior división permitirá, en un lugar concreto de la MP, la amplificación de la señal de polarización por el sistema de GTPasas (Diepeveen et al., 2017) (**Figura 2 B**).

En el caso de la **citoquinesis asimétrica**, el sitio de polarización no es aleatorio y depende del tipo celular. Así, las células haploides presentan un patrón axial de gemación, es decir, la yema emergerá en el mismo polo celular, adyacente a donde tuvo lugar la división anterior, pero nunca en una cicatriz de gemación. En cambio, en células diploides a/ α se establece un patrón bipolar, donde la emergencia de la nueva yema tiene lugar en el polo opuesto a la citoquinesis precedente. El establecimiento de estos patrones recae en los genes denominados 'BUD' (del inglés Budding = gemación). Un grupo central de genes *BUD* estará implicado en el establecimiento de ambos tipos de eje, axial y bipolar. El grupo está compuesto por la proteína GTPasa Bud1/Rsr1 y sus reguladores Bud5 y Bud2, los cuales presentan la función de estabilizar la activación de Cdc42, la GTPasa central en polarización. Además, existen dos grupos de genes específicos de tipo celular, que permitirán la activación de Bud1/Rsr1 en un lugar preciso. Por un lado, en el patrón axial de las células haploides participarán Bud3, Bud4, Axl1, Axl2 y el anillo de septinas, mientras que para el patrón bipolar de las células diploides, jugarán un papel primordial Bud7, Bud8, Bud9, Rax1 y Rax2 (Bi and Park, 2012).

Una vez definido el punto de inicio, un complejo proteico formado por la GTPasa Cdc42 y sus reguladores, permitirá amplificar y establecer la señal de polarización. Como GTPasa, Cdc42 fluctuará entre un estado activo unido a GTP y uno inactivo unido a GDP. Dicho estado estará

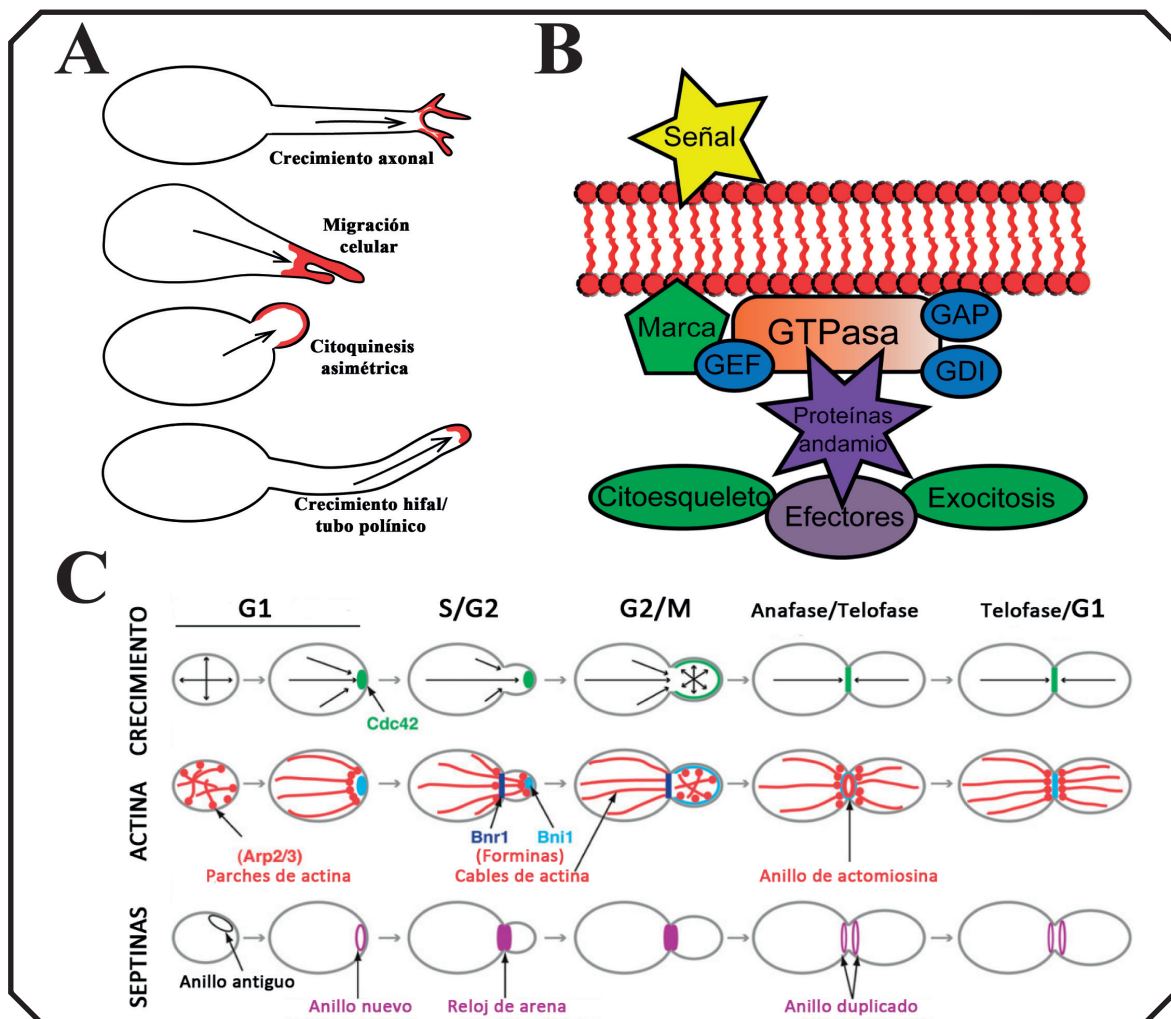


Figura 2. Procesos morfológicos y ciclo celular de *S. cerevisiae*. A) Procesos morfológicos que implican un crecimiento polarizado: crecimiento axonal, migración celular en células del sistema inmune, citocinesis asimétrica en levaduras de gemación, crecimiento hifal o desarrollo del tubo polínico. B) Participación de las GTPasas en procesos de crecimiento polarizado. C) Áreas de crecimiento polarizado y distribución de los elementos del citoesqueleto a lo largo del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Ciclo celular adaptado de Bi and Park, 2012.

controlado por tres tipos de reguladores: GEF o factor de intercambio de nucleótidos de guanina (Cdc24 y Bud3), GAP o activadores de GTPasa (Bem2, Bem3, Rga1 y Rga2) y GDI o inhibidor de la disociación del nucleótido de guanosina (Rdi1). Estos reguladores junto a proteínas con función de andamiaje y elementos del citoesqueleto, van a restringir espacialmente la acumulación de Cdc42 activo. Posteriormente, este núcleo activo interactuará con un grupo de proteínas efectoras que a su vez van a transmitir la señal de activación a otras proteínas GTPasa, al complejo del exocisto y al citoesqueleto, con el fin último de redirigir la maquinaria de secreción al punto de polarización (Bi and Park, 2012; Diepeveen et al., 2017) (Figura 2 B).

De este modo, la citocinesis asimétrica de la levadura de gemación conlleva una síntesis y deposición de los componentes de la MP y la pared celular (PC), con una clara restricción espacial y, por supuesto, temporal. Dicha restricción es controlada por un complejo programa denominado ciclo celular. Para una revisión de la localización de las áreas de crecimiento polarizado y los

INTRODUCCIÓN

componentes del citoesqueleto en el contexto del ciclo celular ver figura **Figura 2 C** y (Bi and Park, 2012).

Otro mecanismo de polarización celular descrito en la levadura de gemación es la **hiperpolarización durante la conjugación** entre dos células haploides de sexo opuesto. En este proceso participa un receptor acoplado a una proteína G heterotrimérica (GPCR), que al reconocer la feromona liberada por el sexo opuesto, establecerá el sitio de inicio del crecimiento hiperpolarizado y, en caso de contacto con la otra célula, mediará la fusión celular y cariogamia (**Figura 3**). El reconocimiento de la feromona activaría a la GTPasa Cdc42 disparando además a la cascada MAPKKK específica de conjugación. A través de ellas se bloquea el ciclo celular en fase G1 y se reorientan los cables de actina para facilitar la secreción durante el crecimiento hiperpolarizado. Finalmente, y a través del activador transcripcional Ste12, se expresarán los genes específicos del programa de conjugación que mediarán la fusión de las MPs y finalmente la fusión de los núcleos que de lugar a la célula diploide. Revisado en Alvaro and Thorner, 2016.

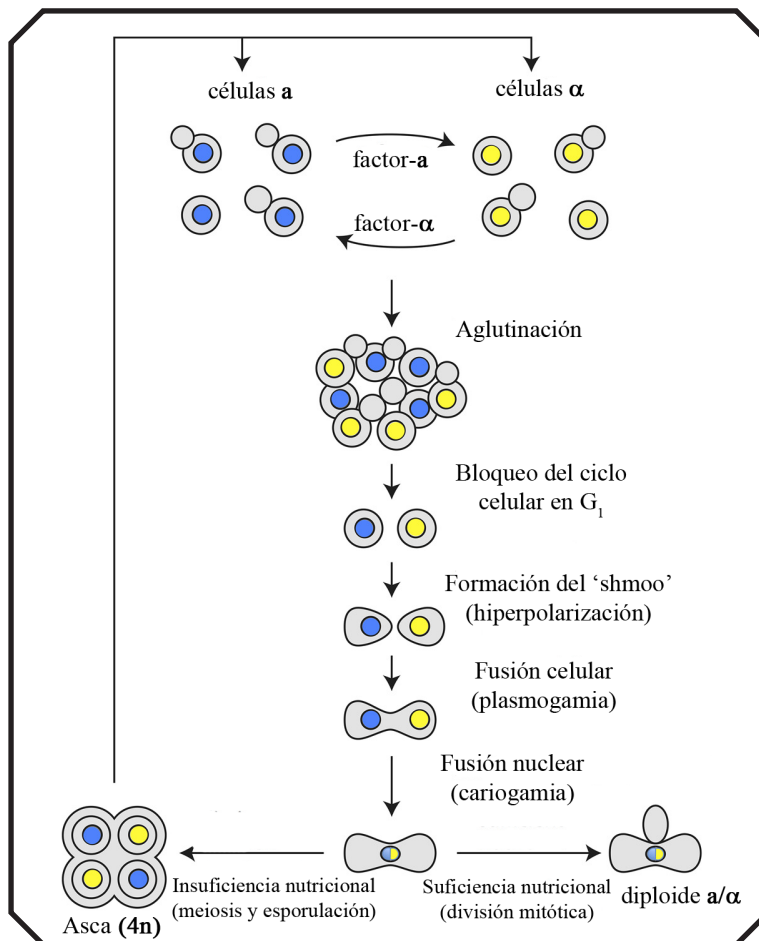


Figura 3. Proceso de conjugación en *S. cerevisiae*. Las células haploides de distinto sexo liberan feromonas que son reconocidas por el sexo opuesto. La recepción de dicha feromona desencadena un complejo proceso denominado conjugación sexual que dará lugar a una célula diploide. Si existe suficiencia nutricional en el medio, la célula se dividirá continuamente por mitosis. Si hay escasez de nutrientes, sufrirá meiosis para dar lugar a un asca con 4 esporas haploides que al germinar comenzarán el ciclo. Adaptado de Alvaro and Thorner, 2016.

3. INTERACCIÓN CON EL MEDIO: LA MEMBRANA PLASMÁTICA Y LA PARED CELULAR

3.1. Relevancia biológica

La membrana plasmática (MP) y la pared celular (PC), o matriz extracelular en metazoos, conforman una estructura imprescindible para la viabilidad celular. A cualquier nivel de la escala evolutiva, las células se comunican con el medio que les rodea mediante la liberación de moléculas que después son reconocidas por receptores, muchos de los cuales están presentes en la MP. Estos receptores emitirán una señal que permitirá a la célula responder al estímulo. A veces, el factor señal tiene que entrar en la célula, y para ello utiliza un transportador específico que está presente en la MP, tal es el caso de algunos receptores de los contactos sinápticos. En la MP también existe una batería de transportadores y bombas que permiten el flujo selectivo de iones dentro y fuera de la célula. El control de estos transportadores permite mantener balances tan importantes para la viabilidad celular como el potencial de membrana, imprescindible para la neurotransmisión, o el pH citosólico, que permite las reacciones enzimáticas que tienen lugar en él. Además, la función nutricional está también condicionada por la actividad de la MP gracias a la presencia de transportadores de azúcares, agua, aminoácidos, etc. No hay que olvidar la presencia de moléculas de adhesión en la MP, las cuales se proyectan hacia la matriz extracelular y permiten a la célula la interacción con el medio local. Por último, cabe destacar la importancia de las proteínas que llevan a cabo la síntesis y remodelación de la pared/matriz extracelular (Spang, 2015).

La pared celular fúngica es de vital importancia, entre otras cosas, para la morfogénesis y la supervivencia celular, ya que es la que le proporciona la forma al organismo. Esta estructura rígida aunque maleable, protege a la célula frente a daños físicos y químicos. La PC previene de la muerte celular por cambios bruscos en el potencial osmótico del entorno; sirve de barrera frente al calor y frío extremo, y evita la desecación celular. Además, la PC confiere a la célula propiedades de adhesión que son imprescindibles para la colonización de nuevos ambientes. Por otro lado, esta estructura es especialmente crítica para los hongos patógenos, ya que les proporciona capacidad adhesiva para la invasión en los tejidos del hospedador, así como protección frente a los mecanismos de defensa del mismo. Asimismo, esta estructura le sirve a la célula de filtro selectivo evitando la entrada de agentes citotóxicos (Free, 2013; Levin, 2011).

3.2. Pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

A grandes rasgos, podemos decir que la PC de la levadura de gemación es una red tridimensional compuesta por dos capas bien definidas. La más interna está compuesta por una matriz entrelazada de polisacáridos de β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y quitina (β -1,4-N-Acetil-Glucosamina), a la que se une la capa externa que está constituida por glicoproteínas (**Figura 4**). Los polisacáridos se generan por la síntesis y extrusión del polímero lineal al espacio periplásmico mediada por las enzimas β -glucán sintasas (Fks1 y Fks2) y quitín sintasas (Chs1, Chs2 y Chs3), que se sitúan en la MP. Cada una de las sintasas presenta un patrón concreto de actuación, acotado espacial y temporalmente (Roncero, 2002). Las glicoproteínas son sintetizadas en el Retículo Endoplásmico (RE), modificadas a lo largo de la ruta secretora y liberadas mediante vesículas. Algunas quedarán unidas directamente a los extremos reductores del β -1,3-glucano (Pir-CWP) y otras indirectamente a los extremos no reductores del β -1,6-glucano (GPI-CWP). Luego, por acción de diversas enzimas transferasas, que

han sido previamente secretadas al espacio de la pared, se formarán los enlaces covalentes entre los diferentes polisacáridos y entre las proteínas y los polisacáridos (Cabib and Arroyo, 2013; Levin, 2011; Roncero, 2002; Smits et al., 2001) (Figura 4).

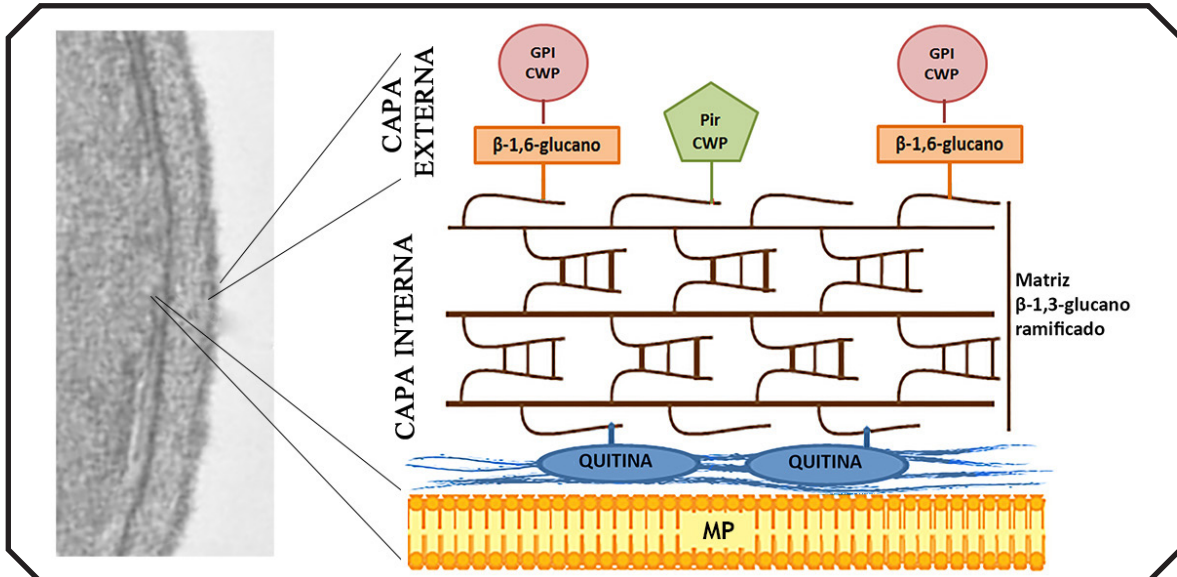


Figura 4. Pared celular de *S. cerevisiae*. Al microscopio electrónico de transmisión (imagen de la izquierda) se puede observar una doble capa por fuera de la bicapa lipídica. Una capa interna más laxa a los electrones, a base de quitina y glucanos, y una capa externa, más electro-densa, compuesta fundamentalmente por proteínas. Adaptado de Smits et al., 2001.

3.3. Transporte trans-membranal

Pocas moléculas son capaces de atravesar las membranas celulares por sí mismas. Incluso, las moléculas que son capaces de difundir a través de la doble capa de fosfolípidos, como el agua o la urea, son transportadas de forma más efectiva con la ayuda de transportadores proteicos. En este sentido, la síntesis de gran parte de la pared celular va a depender de la actividad de las enzimas que, embebidas en la MP, van a actuar como auténticos transportadores que, sirviéndose de los monómeros, van a sintetizar el polímero hacia el exterior celular.

Según las últimas clasificaciones, existen dos clases generales de proteínas transportadoras: canales y transportadores activos. Los **canales o poros** son proteínas o conjuntos de proteínas que forman un hueco que permite el paso de un soluto a favor de un gradiente electroquímico; su apertura o cierre puede estar regulado por señales químicas o electrofisiológicas. Los **transportadores activos** se diferencian en dos familias: los que llevan a cabo el transporte activo primario acoplado a la hidrólisis de ATP, comúnmente llamados bombas, y los transportadores secundarios, transportadores *sensu stricto*, que funcionan a favor de un gradiente electroquímico. Las **bombas o transportadores primarios** generalmente llevan a cabo un transporte acoplado a la liberación de energía por hidrólisis de ATP, pero también llevan a cabo el mecanismo opuesto, es decir, la fosforilación de ADP en ATP a cambio de translocar un soluto a favor de gradiente, como en el caso de la ATPasa mitocondrial. Al igual que en el caso de las bombas, dentro de los **transportadores secundarios** hay varias familias y superfamilias, pero históricamente se han clasificado en tres tipos

según la dirección de los solutos transportados. Así pues, existe un transporte en el que un solo tipo de molécula es direccionada a favor de gradiente o uniporte, y un co-transporte donde se transporta una molécula en contra de gradiente gracias al transporte de otra a favor del gradiente, que puede ser simporte si ambas moléculas van en la misma dirección o antiporte si van en dirección opuesta (Dahl et al., 2004).

4. TRANSPORTE INTRACELULAR DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA

4.1. Transporte entre compartimentos celulares

El transporte entre los diversos orgánulos celulares aporta el material necesario para la correcta función de los propios orgánulos incluida la MP, así como permite la exocitosis celular de los componentes que formarán parte de la matriz extracelular/PC y los que participarán en la señalización entre células. La célula presenta diversos mecanismos que mantienen la homeostasis en el transporte entre los orgánulos, ya que estos compartimentos tienen que mantener un flujo constante de material tanto de entrada como de salida. Un ejemplo de la importancia de estos mecanismos lo constituye una plétora de enfermedades humanas cuya causa es la alteración de este tráfico intracelular (Kins et al., 2006; Schonhaler et al., 2008).

A mediados de la década de los 70, con el auge del uso de la microscopía electrónica de transmisión para analizar muestras biológicas, un grupo de investigadores en torno a la figura de George Palade, observó que las proteínas que iban a ser secretadas al exterior celular a menudo se localizaban en pequeñas esferas que se hallaban dispersas entre los grandes orgánulos, véase Golgi y RE. Estas observaciones dieron lugar a la teoría del transporte vesicular que define que el transporte entre orgánulos se lleva a cabo por intermediarios vesiculares (Palade, 1975). Más tarde, con la participación de numerosos grupos, se llegó a la conclusión de que este proceso no solo existía en los organismos vivos, sino que además era un proceso imprescindible para su viabilidad (Rothman and Wieland, 1996; Schekman and Orci, 1996). Así, el transporte vesicular se define como un proceso vectorial en el cual una vesícula, con el material pertinente, generada a partir de un orgánulo donador, será dirigida de un modo altamente específico a un compartimento receptor, donde se producirá la fusión de ambas membranas, liberando así el contenido. Para mantener la homeostasis del proceso, ha de existir un transporte retrógrado que permita el reciclado de los componentes que participaron en la formación y fusión de la vesícula original. Revisado en Bonifacino and Glick, 2004; Spang, 2008.

Aunque en un principio se pensó que todo el transporte entre orgánulos se llevaba a cabo por pequeñas vesículas esféricas (diámetro < 100nm), el tamaño y las morfologías de los intermediarios del transporte varían. Tal es el caso de las estructuras tubulares que se generan en el transporte post-Golgi y entre los diferentes endosomas (Bonifacino and Rojas, 2006; De Matteis and Luini, 2008). Sin embargo, independientemente de la morfología, la duración de estos intermediarios cumple los principios básicos de la teoría vesicular.

De este modo, el tráfico de componentes entre los orgánulos conlleva un proceso altamente específico y coordinado en el que participan múltiples elementos: proteínas GTPasa y sus reguladores, cubiertas y adaptadores, proteínas de tipo SNARE y complejos amarra (Tethering

factors), el citoesqueleto y sus proteínas motoras, fosfoinosítidos junto a sus quinasas y fosfatasa, así como elementos de unión y regulación que pueden ser agrupados como elementos de andamiaje (Scaffolds) (Spang, 2008).

4.2. Proceso de vesiculación

El proceso comienza por una acumulación de elementos en regiones concretas de los orgánulos, así, el material lipídico y proteico a transportar se va agrupando, y para ello son esenciales las proteínas GTPasa de la familia Arf, que además ayudarán a concentrar las cubiertas, proteínas adaptadoras, SNAREs y diversas proteínas ligadas al citoesqueleto (Springer et al., 1999). Aunque se desconoce el mecanismo preciso que dispara el proceso, se sabe que las GTPasas implicadas en transporte vesicular junto a sus reguladores GAP, GEF y GDI, son capaces de detectar señales para comenzar el proceso. En este contexto cabe destacar la gran variedad de dominios membranosos que existen en todos los orgánulos, que entre otras cosas van a marcar los lugares donde se llevan a cabo fenómenos de vesiculación (Lingwood and Simons, 2010). Estos dominios están enriquecidos en especies concretas de lípidos, siendo de gran relevancia el papel de los fosfoinosítidos y cada una de sus variantes (De Craene et al., 2017). Así, los GAPs, GEFs y GDIs, interaccionando con los lípidos y otras moléculas señalizadoras, van a definir los lugares de activación de las GTPasas. Esta activación atraerá maquinaria adicional que permitirá una acumulación del cargo a transportar. De especial importancia es la acumulación necesaria de las proteínas SNAREs, ya que posteriormente estas mediarán el proceso de fusión con el orgánulo receptor (Spang, 2008).

A continuación tendrá lugar el proceso de vesiculación o formación del intermediario de transporte, que consta de una fase de deformación de la membrana, una de elongación del intermediario y una de escisión final de la membrana (Anitei and Hoflack, 2011) (**Figura 5**). Así, la deformación inicial de la membrana donadora tendrá lugar por una activación masiva de proteínas GTPasa, que atraerá a múltiples efectores que comenzarán a deformar la bicapa lipídica hacia el lado conveniente, que en el caso del transporte entre orgánulos sería hacia el citoplasma. Sin embargo, en algunos procesos hay una evaginación de la membrana hacia el lado del lumen del orgánulo, como ocurre en la formación del cuerpo multi-vesicular, un tipo específico de endosoma (Schöneberg et al., 2016). Entre los efectores, cabe destacar el papel de las cubiertas y los adaptadores en la deformación de la membrana. Estos últimos tienen un papel pasivo como nexo entre la cubierta y las proteínas cargo, así como un papel activo en el reconocimiento y acumulación de cargos (Bonifacino, 2014; Bonifacino and Glick, 2004). Por otro lado, en la mayor parte de procesos de vesiculación es de vital importancia algún elemento del citoesqueleto y proteínas anexas (Anitei and Hoflack, 2011). Así, la polimerización de filamentos de actina junto a la fuerza ejercida por miosinas de tipo I, son necesarias para la vesiculación que tiene lugar en la endocitosis dependiente de actina (Boettner et al., 2012). Entre las proteínas accesorias que participan, cabe destacar aquellas que tienen dominios ENTH/ANTH, que son capaces de profundizar en la bicapa lipídica mediando su deformación, y las que tienen dominios BAR, que son auténticos detectores del estado de curvatura de la membrana. Además, las proteínas que van a ser transportadas pueden jugar un papel importante en la estabilización de las cubiertas en la vesícula naciente (Sandmann et al., 2003). Una vez comenzada la deformación, tendrá lugar un proceso de elongación del intermediario, que como se mencionó anteriormente puede variar drásticamente en tamaño y morfología. Se ha visto que en este proceso participan tanto algunas quinasas y fosfatasa que modifican la composición de fosfoinosítidos como

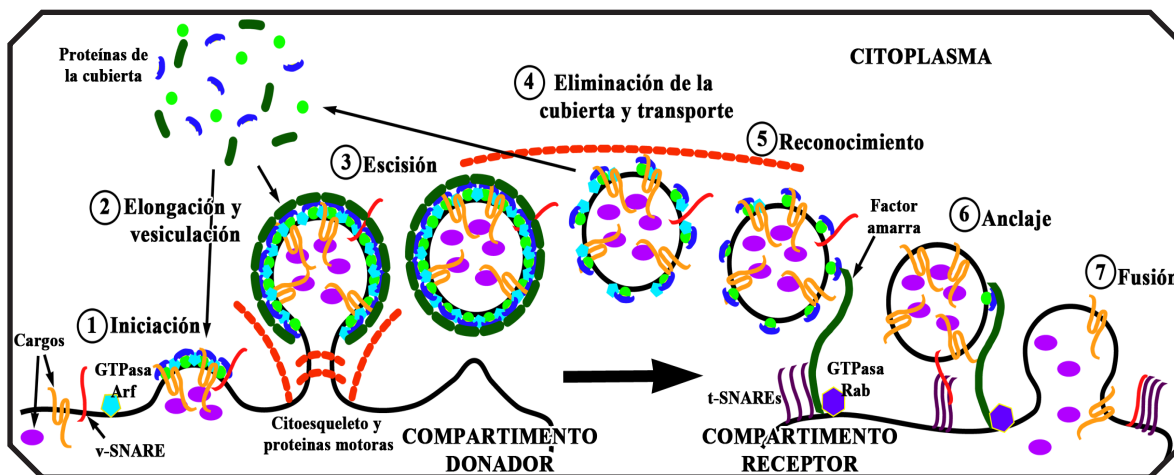


Figura 5. Proceso de Vesiculación. La vesiculación es un proceso unidireccional, hay un transporte desde un compartimento donador a uno receptor. **1)** Iniciación: acumulación del cargo y los primeros elementos para la formación de la vesícula. **2)** Elongación y vesiculación: se reclutan secuencialmente el resto de elementos de la cubierta, y junto a las proteínas del citoesqueleto se produce la deformación de la membrana. **3)** Escisión de la vesícula. **4)** Eliminación de la cubierta y transporte de la vesícula. **5)** Reconocimiento de la vesícula por los factores amarra. **6)** Anclaje al compartimento receptor gracias a las SNAREs. **7)** Fusión de la vesícula al compartimento receptor. Basado en Bonifacino and Glick, 2004.

el citoesqueleto de actina y miosina en el caso de pequeños intermediarios y los microtúbulos en las grandes estructuras. Además, las cubiertas tendrán un papel fundamental en la morfología final del intermediario de transporte. Así, en el caso de la endocitosis mediada por clatrina, el ensamblaje de trisqueliones de clatrina terminará generando un estructura esférica (Boettner et al., 2012; Fotin et al., 2004), mientras que el complejo del retrómero generará estructuras tubulares en el transporte retrógrado desde endosomas a la red *trans*-Golgi (Bonifacino and Hurley, 2008; Burd and Cullen, 2014). Finalmente, tendrá lugar el proceso de escisión de membranas. Para ello, diversas enzimas cambian la composición lipídica de la futura zona de fisión, donde posteriormente actuarán las cubiertas y el citoesqueleto para generar la fuerza física que terminarán con la escisión del intermediario. En el caso de mamíferos, la GTPasa dinamina desempeña un papel fundamental generando un collar que mediará la constricción de la membrana (Anitei and Hoflack, 2011).

Una vez formado el intermediario, tendrá lugar un proceso de transporte, eliminación de la cubierta, reconocimiento y fusión con el compartimento receptor (**Figura 5**). El transporte a larga distancia requiere del citoesqueleto de actina/tubulina y proteínas motoras. Sin embargo, en determinadas situaciones, las distancias entre orgánulo donador y aceptor son tan pequeñas, que el citoesqueleto no juega un papel tan relevante, tal es el caso del transporte RE-Golgi. Para obtener información más detallada acerca del transporte de vesículas mediado por el citoesqueleto ver (Barlan and Gelfand, 2017). Probablemente, y de forma gradual a lo largo de este transporte tenga lugar la eliminación de la cubierta, ya que la presencia de una cubierta completa impediría la fusión del intermediario con el orgánulo aceptor. Este proceso se llevaría a cabo mediante la inactivación de las GTPasas que controlan la formación de la vesícula y con el reclutamiento de factores desestabilizadores de la cubierta, tales como las auxilinas y la chaperona Hsp70 en el caso de la cubierta de clatrina (Ungewickell et al., 1995). Una vez que la vesícula está liberada de su cubierta, los complejos amarra, específicos de cada orgánulo aceptor, reconocerán la vesícula aproximándola hacia la membrana. En este proceso de acercamiento, es importante el papel de

las GTPasas de la familia Ypt/Rab. Por otro lado, en los últimos años diversos estudios apuntan a que el proceso de eliminación de la cubierta en muchos casos no es un proceso inmediato tras la formación del intermediario, sino que está directamente coordinado por la interacción con los complejos amarra ya en las proximidades de la membrana receptora. Al igual que las cubiertas y sus adaptadores, existe gran variedad de complejos/factores amarra, que son específicos para el transporte de un orgánulo concreto a otro. La mayor parte de estos factores no tienen dominios transmembrana por lo que necesitan ser reclutados desde el citoplasma hasta las membranas del compartimento receptor. Entre estos factores destacan las propias SNAREs, como es el caso de Sec20 y Use1 que recluta el complejo amarra Dsl1 implicado en el transporte retrógrado Golgi-RE, o las GTPasas de la familia Ypt/Rab, como Ypt1(Rab1) para el mismo complejo Dsl1 (revisado en Schroeter et al., 2016). Finalmente tendrá lugar la fusión de la vesícula con el compartimento aceptor (**Figura 5**). En este proceso es fundamental el papel de las SNAREs y proteínas que regulan su función. Así, el grupo de Rothman propuso la hipótesis de las SNAREs, que esencialmente consiste en que cada tipo de vesícula tiene una v-SNARE específica que se une a una t-SNARE específica en el compartimento aceptor (Rothman and Wieland, 1996). La mayor parte de estas proteínas están ancladas a las membranas por su dominio C-terminal transmembrana. El dominio N-terminal es el encargado de generar las uniones con otras SNAREs. El lazo que mediará la posterior fusión de membranas se genera por unión de una α -hélice de un monómero v-SNARE con 3 α -hélices de un oligómero t-SNARE. Esta unión estable, junto con la participación de otros factores, permitirá la fusión final de la vesícula con el compartimento aceptor, con la consiguiente liberación del material. Para una revisión más detallada del mecanismo de fusión ver (Risselada and Grubmüller, 2012). Por último, con el fin de participar en una nueva ronda de fusión, las v-SNAREs tienen que ser recicladas al compartimento donador. Con ese fin, mediante un gasto asociado de ATP, la ATPasa NSF disocia la unión v-SNARE – t-SNARE, que deja libre la v-SNARE para ser reciclada por vesiculación retrógrada (**Figura 5**). Revisado en Bonifacino and Glick, 2004.

4.3. Las proteínas con dominios transmembrana: el cargo del tráfico intracelular

Las llamadas proteínas de membrana pueden unirse a ella a través de enlaces no covalentes, enlaces lipídicos o ser parte integral de ella. Estas últimas son las proteínas integrales de membrana o transmembrana y constituyen el 20-30% del proteoma en células eucariotas. Pueden tener un solo dominio transmembrana (Trans-Membrane Domain = TMD) o constituir un agregado voluminoso que puede comprender hasta 20 TMDs (Shao and Hegde, 2011). Según la orientación de su extremo N-terminal, las proteínas transmembrana se clasifican en tipo I, si lo tienen orientado hacia el lumen del RE, y de tipo II, si se orienta hacia el citosol.

Todas las proteínas transmembrana, independientemente de su localización, se insertan en la membrana del RE mediante dos vías diferentes: la co-traducciona, es decir, a la vez que el ribosoma va sintetizando la proteína, esta se va introduciendo en la membrana; y la post-traducciona, donde la proteína es embebida en la membrana después de ser traducida. La mayor parte de las proteínas integrales usan la vía co-traducciona, la cual implica un bloqueo de la transcripción, un reconocimiento de señales, un ajuste del ribosoma con el canal translocón Sec61 y un acoplamiento de la síntesis proteica con el correcto plegamiento en torno a este canal. Por el contrario, hay pocas

proteínas que siguen la ruta post-traducciona, algunos ejemplos son proteínas extremadamente pequeñas y la mayor parte de las proteínas con cola C-terminal anclada en la membrana. En este proceso, en lugar del translocón Sec61, participa el complejo TRC40/GET. Revisado en Shao and Hegde, 2011; Denks et al., 2014.

4.4. Panorámica de las rutas de transporte intracelular

En células eucariotas, la **ruta secretora** y la **ruta endocítica** son las encargadas de mediar el transporte de las proteínas recién sintetizadas y el reciclaje de las preexistentes entre los diferentes compartimentos sub-celulares. Los orgánulos conectados por estas rutas constituyen el **sistema de endomembranas** y son: RE, Golgi, endosomas, vacuola/lisosoma, membrana plasmática y gránulos secretores. Aquí quedan excluidos otros orgánulos membranosos como mitocondria o plastidios. El sistema de endomembranas es una unidad funcional fuertemente conectada, mientras que los otros orgánulos presentan menor conexión y un origen evolutivo exclusivo (Schlacht et al., 2014). Una vez las proteínas solubles han sido sintetizadas e introducidas en el RE o insertadas en su membrana, en el caso de las integrales de membrana, estas serán dirigidas a través de estas dos rutas interconectadas sufriendo las modificaciones pertinentes hasta alcanzar su destino, lugar donde desarrollará su función, para después ser recicladas para un nuevo uso o ser degradadas para obtener sus aminoácidos (Derby and Gleeson, 2007).

El camino comienza en el RE, que es el orgánulo más extenso en términos de superficie en la mayoría de las células eucariotas. Este se extiende por toda la célula, y en el caso de las levaduras se extiende por una región peri-nuclear y por una cortical adyacente a la membrana plasmática (MP). Es aquí donde tiene lugar la síntesis y el correcto plegamiento de las proteínas, unido al comienzo de su glicosilación. Antes de abandonar este compartimento, las proteínas se ven sometidas a un estricto control de calidad. Así, múltiples proteínas, llamadas genéricamente chaperonas, van a adherirse a las proteínas recién sintetizadas en sus superficies hidrofóbicas, en regiones con cisteínas desapareadas o con glicanos inmaduros, evitando así su agregación y asistiendo en su correcto plegamiento. Cuando, tras varias rondas de reordenamientos, la proteína sigue presentando una conformación errónea, el sistema conocido como ERAD mediará la expulsión de la proteína en cuestión fuera del RE a través del canal del translocón. Una vez fuera, la proteína será degradada por el complejo del proteasoma 26S. Cuando la proteína ha adquirido una conformación adecuada, se concentra en regiones concretas del RE denominadas ERES (del inglés: ER Exit Sites), donde gracias a numerosos efectores como la GTPasa Sar1 se generará una vesícula con cubierta COPII, encargada de mediar el transporte de las proteínas desde el RE hasta el aparato de Golgi (**Figura 6**). Aunque las vesículas de tipo COPII probablemente constituyan la vía de exporte mayoritaria, también existe un transporte independiente de esta cubierta. En el caso de mamíferos la región receptora del Golgi se denomina ERGIC (del inglés: ER-Golgi Intermediate Compartment). En el caso de las levaduras no existe una estructura tan diferenciada, y el espacio entre RE y Golgi es escasamente de 100 nm, de tal forma que se ha postulado un contacto físico entre las membranas de ambos compartimentos (Kurokawa et al., 2014). Revisado en Derby and Gleeson, 2007; Spang, 2015.

Una vez en las cisternas del Golgi, las proteínas pueden seguir hacia adelante, es decir en dirección cis-trans, o ser enviadas de vuelta al RE, bien porque constituyen parte de la maquinaria del transporte RE-Golgi y tienen que ser recicladas, o bien porque no estaban correctamente plegadas y las chaperonas tienen que volver a hacer su trabajo sobre la proteína en cuestión. El transporte

retrógrado, tanto de Golgi hacia RE como de cisternas de una zona posterior a una anterior, es mediado por las vesículas de tipo COPI (**Figura 6**). El aparato de Golgi presenta una morfología variable a lo largo de la escala evolutiva; desde múltiples agregados de varias cisternas (dictiosomas) en mamíferos, hasta unas pocas cisternas no apiladas en *S. cerevisiae*. Se han propuesto varios modelos de funcionamiento del Golgi, pero hoy en día la hipótesis más aceptada es una mezcla de dos hipótesis pre-existentes: maduración de las cisternas junto a un transporte vesicular entre las mismas. Funcionalmente, las regiones del Golgi se pueden clasificar en tres. La región adyacente al RE o región cis, incluido el ERGIC de mamíferos, recibe material del RE que permitirá generar las cisternas del Golgi. La siguiente región lo constituyen las cisternas medial y trans, y su función principal será la de continuar con la modificación del esqueleto de carbohidratos pre-existente en las proteínas que venían del RE. Por último, está la región encargada de la distribución de las proteínas (y lípidos) hacia otros compartimentos, es lo que se conoce como red *trans*-Golgi o TGN

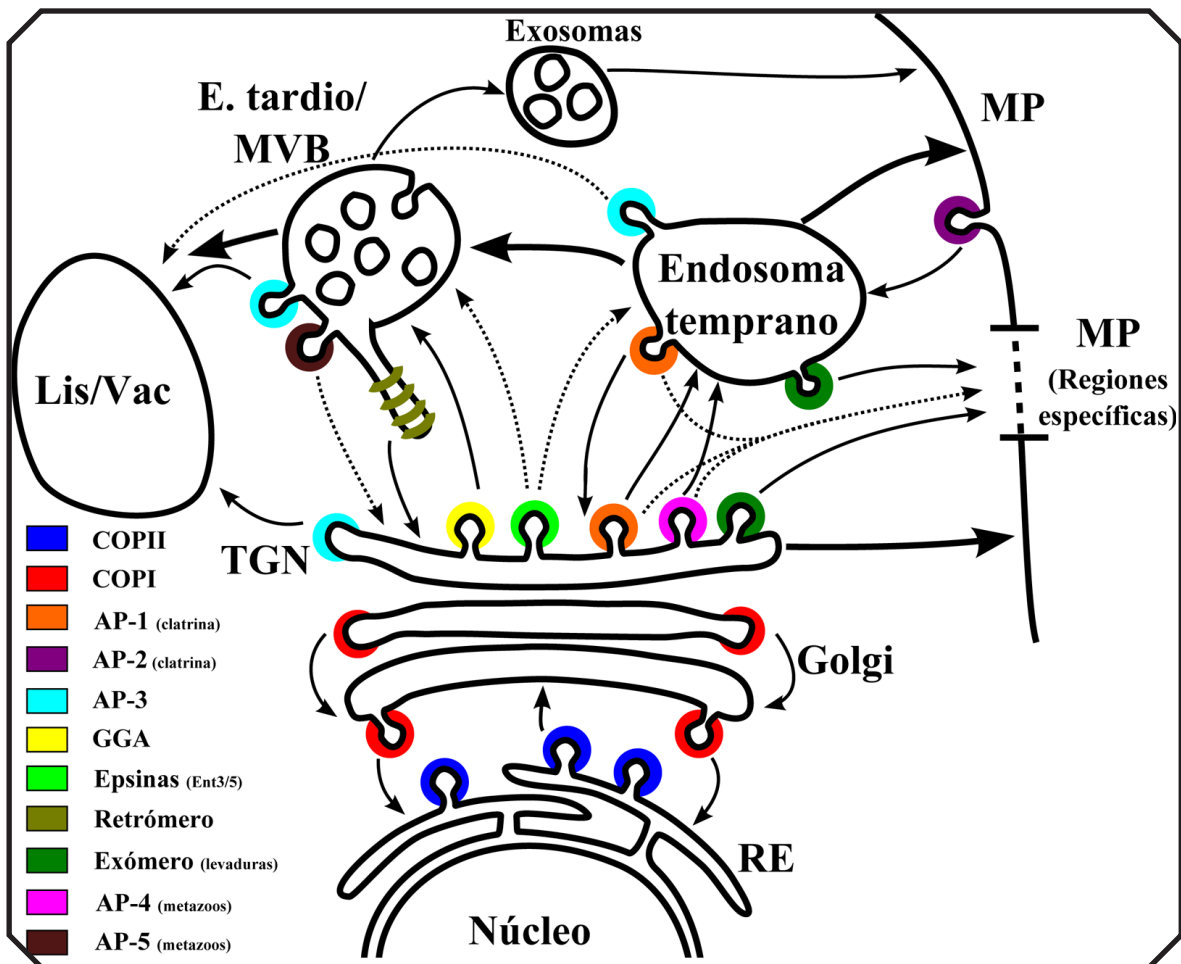


Figura 6. Adaptadores y cubiertas en el sistema membranoso de metazoos y levaduras. Representación de las principales cubiertas y adaptadores presentes en metazoos y levaduras, tanto las comunes como las específicas. Tanto los adaptadores específicos de linaje como los que usan cubierta de clatrina están indicados en la leyenda. Las flechas indican la dirección del transporte en el que están implicados. Se puede observar la gran variedad de alternativas de transporte entre TGN, endosomas y MP. Notas: las flechas discontinuas denotan un transporte con menos evidencias que las continuas, y las flechas grandes hacen referencia a la existencia de un transporte alternativo independiente de estos adaptadores/cubiertas. En levaduras el exómero media un transporte hacia regiones específicas de la MP. RE, retículo endoplásmico; TGN, red *trans*-Golgi; MVB, cuerpo multivesicular; Lis, lisosoma; Vac, vacuola; MP, membrana plasmática.

(del inglés *trans-Golgi network*). Revisado en Papanikou and Glick, 2014.

Una vez en el TGN, las proteínas van a ser 'catalogadas' y distribuidas en diferentes intermediarios de transporte para ser dirigidas al resto de compartimentos de la ruta secretora y la ruta endocítica. De este modo, el TGN se puede considerar como una estación central en el transporte intracelular de proteínas. Así, en esta zona se recluta gran diversidad de adaptadores y cubiertas que mediarán la selección del cargo y su transporte a los endosomas, lisosoma/vacuola, vesículas de secreción o la membrana plasmática (**Figura 6**). A esta variedad de adaptadores hay que sumarle elementos del citoesqueleto, proteínas motoras y GTPasas, además de los factores amarra reclutados en el orgánulo de destino, que van a multiplicar el abanico de posibilidades de transporte. En este punto, una proteína puede ser enviada hacia el lisosoma/vacuola gracias al adaptador AP-3 de una forma directa como ocurre en levaduras, o a través de los endosomas como ocurre en metazoos. Por otro lado, la proteína puede viajar a la membrana plasmática (MP), también de forma directa o a través de un paso por los endosomas. En levaduras muchas proteínas requieren pasar por los endosomas para llegar a la MP, proceso asistido por cubiertas de AP-1. En metazoos, la localización de proteínas en dominios específicos de la MP (membrana baso-lateral y apical en epitelios) requiere de las distintas variantes del complejo AP-1 y en menor medida de AP-4. Ayudando en esta segregación se encuentran los adaptadores GGAs y las epsinas (Ent3/5 en *S. cerevisiae*). Para complicar aún más su entendimiento, existen a mayores otros adaptadores/cubiertas implicadas en el transporte de unas pocas proteínas. Tal es el caso del exómero en levaduras, que media el transporte de unas pocas proteínas directamente desde el TGN hasta la MP (**Figura 6**). Existen múltiples evidencias que señalan a la competencia de estos adaptadores por el reconocimiento de diversas señales (señales peptídicas, ubiquitinaciones, fosforilaciones...), presentes en las colas citosólicas de los cargos con dominios transmembrana, como un importante determinante de la distribución de los cargos. Revisado en Bonifacino, 2014; Spang, 2015.

Como se mencionó anteriormente, a partir del TGN, existe una absoluta conexión con los compartimentos que definen la ruta endocítica. Esta comienza en la MP donde tras la endocitosis de proteínas y lípidos, ya sea mediada por clatrina y el adaptador AP-2 o independientemente de la clatrina, se generan los endosomas tempranos. Estos van madurando gracias a las enzimas generadas en la ruta secretora hasta llegar al último eslabón, la vacuola/lisosoma, lugar donde se descompondrán las proteínas en los correspondientes monómeros reutilizables. En este proceso de maduración cabe destacar la transición de la GTPasa Rab5 (Vps21) por Rab7 (Ypt7), el cambio en fosfoinosítidos de PI3P por PI3,5P₂, la transición del complejo amarra CORVET en el complejo HOPS, la generación de las vesículas intraluminales mediadas por el complejo del ESCRT, así como una acidificación del pH luminal mediado por la V-ATPasa. Sin embargo, a lo largo de este proceso también existe un tránsito bidireccional de proteínas con el TGN. A parte de los complejos AP mencionados anteriormente que poseían funciones bidireccionales entre TGN y endosomas, existen otras cubiertas/adaptadores que median el transporte desde endosomas hasta el TGN. Tal es el caso del retrómero, nexinas y el recientemente descubierto AP-5 (**Figura 6**). Revisado en Hierro et al., 2015.

4.5. Homeostasis de la membrana plasmática: secreción y endocitosis regulada.

4.5.1. Salida del TGN hacia la MP: exocitosis.

Como ya se describió en el punto anterior, las proteínas, tras llegar a la red *trans*-Golgi (TGN) van a ser segregadas en diferentes regiones para después ser transportadas a los diferentes orgánulos, incluido la membrana plasmática (MP). Para conseguir esto, es muy importante la regulación y conformación de estos dominios, siendo de especial relevancia las diferentes variedades de fosfoinosítidos (PIPs) y las quinasas y fosfatasa que los generan (De Craene et al., 2017; Santiago-Tirado and Bretscher, 2011) (**Figura 7**). Así, en el TGN tanto de mamíferos como de levaduras existe un gradiente ascendente de PI4P en sus membranas. En levaduras, los niveles de este fosfoinosítido están regulados por la quinasa Pik1 y la fosfatasa Sac1 (Santiago-Tirado and Bretscher, 2011). La definición de estos dominios también está regulada por las GTPasas de las familias Arf y Rab, así como los complejos adaptadores de cubiertas, tanto por permitir la acumulación de cargos como por modular la concentración de PI4P (**Figura 7**).

Existen múltiples evidencias de la coexistencia de varios mecanismos de exocitosis o transporte hacia la MP, aunque se desconoce la naturaleza de muchos de ellos. Algo que parece estar claro es que el viaje de los intermediarios de transporte hasta la membrana es dependiente del citoesqueleto y las proteínas motoras. En el caso de los metazoos, y sobre todo en células fuertemente polarizadas como las neuronas, los microtúbulos y la proteína motora kinesina son indispensables para la exocitosis (Noordstra and Akhmanova, 2017). Por su parte, en *S. cerevisiae*, este transporte es mediado por la miosina Myo2 a través de los filamentos de actina (Hammer and Sellers, 2011). A grandes rasgos se sabe que hay una secreción constitutiva, regulada por la maquinaria de polarización de la célula (ver apartado de polarización), y una secreción regulada por múltiples señales. En *S. cerevisiae* se han identificado al menos dos tipos de transporte teniendo en cuenta la densidad de sus vesículas y el contenido proteico de las mismas. Así, las vesículas de alta densidad contienen exoglucanasa e invertasa, mientras que las de baja densidad contienen Pma1, Hxt2, Fus1, Chs3 y probablemente otras proteínas diferentes (Bagnat and Simons, 2002; Barfield et al., 2009; Harsay and Bretscher, 1995; Harsay and Schekman, 2002; Kruckeberg et al., 1999). Además, entre las vesículas de baja densidad parecen coexistir varios tipos de transporte, modulados tanto por los elementos de la maquinaria general como por complejos específicos de transporte, como es el caso del exómero (Zanolari et al., 2011). En mamíferos, aunque tampoco se conoce con exactitud, se ha descrito un tipo de vesículas denominadas CARTS, que con cubierta desconocida, median el transporte de proteínas hasta la MP (Wakana et al., 2012). En cuanto a los complejos adaptadores generales que modulan este transporte cabe destacar a AP-1 y AP-4 (**Figura 6**). En el caso de *S. cerevisiae*, AP-1 mediará el transporte hacia la membrana plasmática pero con un paso intermedio por los endosomas (Spang, 2015). En el caso de los metazoos, tanto las diferentes variedades de AP-1 como AP-4, tienen gran importancia en el transporte polarizado hacia la membrana plasmática. En ambos sistemas, se sabe que estos adaptadores son capaces de reconocer señales específicas en las colas citosólicas de las proteínas transmembrana, sin embargo, se desconoce el compartimento específico del cual parten estas vesículas hasta la MP, pudiendo ser desde alguna región del TGN o de algún tipo de endosoma (Bonifacino, 2014).

El proceso de vesiculación desde el TGN hasta la MP en *S. cerevisiae* es independiente de una

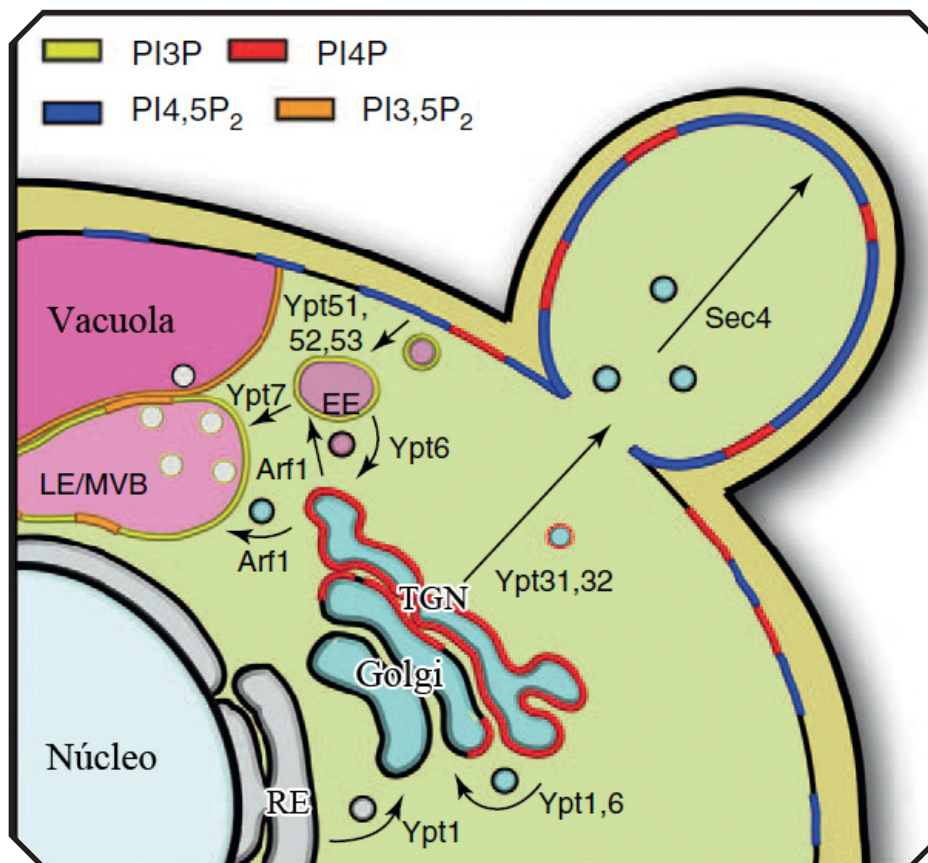


Figura 7. Distribución de fosfoinosítidos y GTPasas en el tráfico intracelular de levaduras. Las flechas indican la dirección del tráfico en el que está implicada cada GTPasa. RE, retículo endoplásmico; TGN, red *trans*-Golgi; EE, endosoma temprano; LE, endosoma tardío; MVB, cuerpo multivesicular. Adaptado de Santiago-Tirado and Bretscher, 2011.

cubierta conocida, y depende del reclutamiento de la Rab GTPasa Ypt31/32 a las membranas ricas en PI4P (**Figura 7**). Una vez activa y reclutada, Ypt31/32 va a atraer a la miosina de tipo V Myo2 y al GEF Sec2. A medida que la vesícula se va aproximando a la MP por acción de la miosina a través de los cables de actina, la concentración de PI4P va ir disminuyendo, lo cual va suponer un cambio en la afinidad de los componentes por la vesícula. Así, la Rab Sec4 será reclutada uniéndose tanto a Myo2 como a Sec2, sustituyendo a su vez a Ypt31/32. A su vez será reclutado Sec15, la primera subunidad del exocisto, complejo amarra que finalmente mediará la fusión de la vesícula con la MP (Hammer and Sellers, 2011; Jin et al., 2011). El exocisto es un complejo amarra altamente conservado en la escala evolutiva, que se localiza en los focos de crecimiento polarizado de la MP, tales como la punta de la yema de las levaduras y los sitios de contacto en células epiteliales polarizadas. En su conformación completa, el exocisto está compuesto por 8 subunidades (Sec3/5/6/8/10/15 y Exo70/84), cada una de ellas con una conformación en barra alargada, que se unen entre sí por uno de los extremos y se proyectan por el otro a modo de ‘mano abierta’. Alrededor de 14 complejos de exocisto son necesarios para mediar la fusión de una vesícula con la MP. Finalmente, las SNAREs que mediarán en *S. cerevisiae* la completa fusión de la vesícula con la MP serán la v-SNARE Snc1/2 y la t-SNARE Sec9 (Guo et al., 2017; Picco et al., 2017).

Otras proteínas cuyo destino es la MP no siguen esta ruta de secreción polarizada, por lo que debe de existir otro tipo de secreción no polarizada, cuya naturaleza está muy pobremente estudiada.

4.5.2. Organización de la membrana plasmática

En las últimas décadas, el concepto de la membrana plasmática como una estructura inmóvil y con función exclusiva de barrera ha cambiado completamente. Así, la MP al igual que las membranas de otros orgánulos sub-celulares presenta tanto una asimetría en la bicapa lipídica como una organización lateral en dominios que varían en tamaño, composición lípido-proteica, dinamismo y funcionalidad.

De este modo, la abundancia de un tipo particular de lípido no es igual a ambos lados de la bicapa de la MP. En la cara interna de la MP se acumulan lípidos con carga negativa como la fosfatidilserina y los fosfoinosítidos (PIPs), mientras que en la cara externa son abundantes la fosfatidilcolina y los esfingolípidos. Esta asimetría es imprescindible para la actividad de receptores, moléculas señalizadoras y la interacción con el citoesqueleto (Ziółkowska et al., 2012).

Derivado de la heterogeneidad descrita por múltiples laboratorios en la organización lateral de la MP, fue acuñado el término de 'Lipid Rafts' o balsas lipídicas. Las balsas lipídicas constituyen fluctuantes agregados de esfingolípidos, esteroides y proteínas con un tamaño teórico < 200 nm, que constituyen auténticas plataformas que median procesos tan importantes como la señalización y el tráfico de proteínas. Además, estos pequeños dominios pueden organizarse en regiones más grandes que desempeñan una función concreta. Este concepto de segregación de la MP en dominios está conservado a lo largo de la escala evolutiva, y supone un incremento en la complejidad de la organización de los procesos en los sistemas biológicos (Sezgin et al., 2017).

En mamíferos, existen al menos dos subgrupos de balsas lipídicas. Las **caveolas** son invaginaciones de la MP que se generan por polimerización de la proteína caveolina que interacciona con esfingolípidos y colesterol. Estas estructuras están implicadas en procesos de endocitosis así como en fenómenos de transducción de señales. El otro subgrupo de balsas lipídicas lo constituyen unas estructuras con composición similar a las caveolas, pero de morfología aplanada, donde las proteínas más importantes en su organización lo constituyen las **flotilinas**. Estas median procesos de señalización como los mediados por las quinasas de la familia Src (Santos and Preta, 2018).

En *S. cerevisiae*, el concepto de balsa lipídica no está suficientemente consensuado, sin embargo, en los últimos años se han descrito varios dominios funcionales de membrana. Se han sugerido al menos tres mecanismos que contribuyen a su formación. (1) Por un lado está el fenómeno de interacción lateral entre lípidos y proteínas que se correspondería con el concepto general de las balsas lipídicas. Este fenómeno implica interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, y parecería que *in vivo* por sí solo únicamente permitiría la conformación de dominios de unos pocos nanómetros, por lo que sería necesario otro tipo de mecanismo para generar grandes dominios. (2) Por otro lado, las proteínas citosólicas pueden formar andamios que interaccionen selectivamente con lípidos de la MP. (3) Por último, complejos proteicos adyacentes a la MP, como los anillos de septinas, pueden actuar como auténticas barreras que eviten la difusión de elementos y favorezcan su concentración en determinadas áreas (Ziółkowska et al., 2012).

En *S. cerevisiae*, una gran porción de la MP es referida como dominio **MCP** (del inglés Membrane Compartment of Pma1) (**Figura 8 A**). Esta región se corresponde con una zona activa donde las

proteínas difunden y se llevan a cabo fenómenos como la secreción, endocitosis y síntesis de la PC. La proteína más abundante y por la que recibe el nombre es Pma1, la H⁺-ATPasa de la MP (Ziółkowska et al., 2012). Aunque menos estudiado, existe otro dominio con alto dinamismo conocido como **MCT** (Membrane Compartiment of TORC2). Este está claramente separado del anterior, y es donde el complejo TORC2 es reclutado y ensamblado. Este complejo participa en múltiples procesos celulares, entre los que cabe destacar la regulación del citoesqueleto de actina y la endocitosis a través de la GTPasa de polaridad celular Rho1, o la síntesis de esfingolípidos, de vital importancia para el mantenimiento de todos estos dominios (Bartlett and Kim, 2014). El dominio más estudiado en levaduras es el **MCC** (Membrane Compartiment of Can1) o también conocido como eisosoma, por ser este último el andamiaje citosólico que lo recubre. A diferencia de otros dominios de membrana, este es muy estable y en la levadura de gemación conforma unos 50 dominios individuales por célula, los cuales se invaginan 50 nm hacia el citoplasma con una longitud de unos 300 nm. En este dominio se agrupan proteínas integrales de membrana como la tetraspanina Sur7 y las permeasas Can1, Tat2 y Fur4. Su organización es co-dependiente de un andamiaje que se forma por el lado citosólico denominado eisosoma. En este participan varias proteínas, donde destacan Pil1 y Lsp1 que con sus dominios BAR son capaces de interactuar con la MP (Foderaro et al., 2017). Finalmente, la quitín sintasa Chs3 parece ocupar un dominio exclusivo de la MP, el **compartimento del cuello (Figura 8 B)**; excluido de los descritos anteriormente, y que engloba un área entre el anillo de septinas y la región de endocitosis mediada por actina (Sacristan et al., 2012). Este dominio parece segregarse lateralmente del resto de dominios probablemente por algún tipo de interacción lipídica aún sin

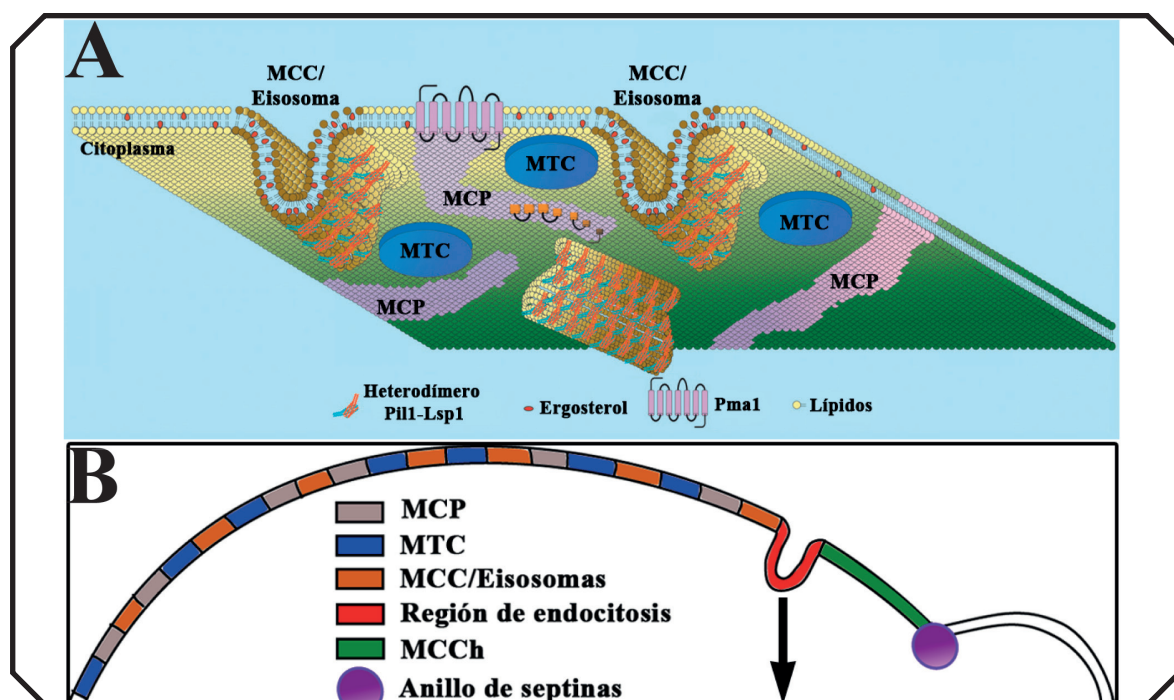


Figura 8. Compartimentalización de la membrana plasmática en *S. cerevisiae*. A) Representación de la distribución de los dominios MCC/Eisosoma, MTC y MCP en la membrana plasmática. Adaptado de Ziółkowska et al., 2012. B) Representación de un corte transversal de una célula de *S. cerevisiae* en gemación con la localización del dominio MCCh en relación a otros dominios/regiones descritas. MCP, compartimento de membrana de Pma1; MTC, compartimento de membrana de TORC2; MCC, compartimento de membrana de Can1; MCCh, compartimento de membrana de Chs3.

especificar (Roncero, 2002; resultados no publicados).

Sobre este boceto de dominios bien diferenciados, la homogeneidad de la distribución de las proteínas transmembrana a lo largo de la MP es muy variable. Por ejemplo, la distribución de la permeasa de aa' Gap1 es casi completamente homogénea, mientras que Sur7 se distribuye en parches bien definidos (MCC). En general, cada tipo de proteína transmembrana ocupa una localización específica en la MP, pero a su vez co-localiza con otras proteínas en mayor o menor medida, constituyendo los dominios antes mencionados. La agrupación en dominios es relevante para la función de dichas proteínas (Spira et al., 2012).

4.5.3. Endocitosis

Ya en la MP, las proteínas integrales pueden desempeñar su función (síntesis de la PC, transmisión de señales, tráfico de nutrientes, etc.). Una vez han realizado su actividad, estas no residen *in saecula saeculorum* en dicho compartimento, sino que la célula enviará a las proteínas de vuelta al compartimento endosomal. Una vez allí, las proteínas o bien pueden ser recicladas hacia la MP o bien pueden ser enviadas a degradar en la vacuola/lisosoma, ya sea porque hayan perdido su función o porque la célula ya no requiera de sus funciones (MacDonald and Piper, 2016).

Todos estos procesos tienen en común el complejo proceso de internalización de la proteína hacia los endosomas, conocido como endocitosis. Este proceso presenta varias alternativas, la más estudiada es la endocitosis dependiente de cubierta de clatrina o CME (del inglés Clatrin-Mediated Endocytosis). Sin embargo, en los últimos años se han sumado evidencias experimentales acerca de la existencia de mecanismos de endocitosis independientes de clatrina. Se cree que mientras la CME media procesos generales de homeostasis celular, la endocitosis independiente de clatrina podría mediar procesos más variopintos y puntuales como la toma desde el medio externo de grandes cantidades de nutrientes (pinocitosis) o la migración celular. Además, se sabe que esta endocitosis alternativa media la entrada de patógenos y toxinas. Para más información revisar referencia Ferreira and Boucrot, 2017.

La CME es un proceso coordinado que requiere del reclutamiento secuencial de numerosas proteínas a la MP, las cuales van a concentrar el cargo o receptor transmembrana, y van a formar vesículas cubiertas de clatrina en el citoplasma. Será de vital importancia la participación de proteínas adaptadoras que permitirán unir el cargo con la cubierta, así como la formación de una malla de filamentos de actina que genere la fuerza necesaria para la formación de la vesícula. En resumen, el proceso conlleva tres fases claramente diferenciadas por su dinámica: (1) fase inmóvil en la que tiene lugar la formación de la cubierta; (2) fase móvil donde los filamentos de actina se conforman, se invagina la MP y se escinde la vesícula; y (3) fase de disolución de la maquinaria (Goode et al., 2015) (**Figura 9**).

En *S. cerevisiae*, para que todo comience tiene que haber un reconocimiento del cargo por los adaptadores de la vesícula. Se han descrito dos tipos de señales: señales peptídicas y ubiquitinas unidas covalentemente al cargo. La ubiquitina (Ub) es una pequeña proteína conservada que puede unirse covalentemente por su glicina C-terminal a un sustrato proteico en un residuo de lisina. Esta unión es llevada a cabo por una cascada enzimática: E1 (Ub-activadora), E2 (Ub-conjugadora) y E3 (Ub-ligasa). Como la Ub tiene a su vez varias lisinas, se le pueden unir otras Ub generando cadenas de poli-ubiquitina, incrementando así el abanico de posibles señales en los cargos. La E3 Ub-ligasa

más importante en la ubiquitinación de cargos que van a ser endocitados es Rsp5. Para llevar a cabo la ligación de la Ub al sustrato, Rsp5 reconoce dominios con secuencia [L/P]PxY. Sin embargo, varios cargos ubiquitinados por Rsp5 carecen de este motivo, para suplir esto, la célula cuenta con una batería de proteínas llamadas α -arrestinas que sirven de puente entre Rsp5 y los cargos. Una vez ubiquitinados, elementos de la cubierta que mediarán la CME, reconocerán dichas señales. En cuanto a las señales peptídicas reconocidas para endocitosis, solo se conoce una, NPF(x)_{1,2}D, y está presente en los receptores de feromona Ste2/3, el sensor Wsc1 y las flipasas de fosfolípidos Drs2 y Dnf1. Revisado en Goode et al., 2015; MacGurn et al., 2012.

La **fase inmóvil** o conformación de la cubierta se divide a su vez en tres etapas bien definidas en las que las proteínas se van a reclutar secuencialmente. (1) La fase de cubierta temprana, que se corresponde con el reclutamiento de Ede1, Pal1, Syp1, el complejo adaptador AP-2 y la clatrina. Se han demostrado interacciones físicas de estos elementos entre sí, con la MP y con elementos de fases posteriores. Además, AP-2 y Syp1 son capaces de interactuar con algunos cargos. Aunque en *S. cerevisiae* no se ha descrito aún interacción física directa de ninguno de estos adaptadores iniciales con la clatrina, es posible que exista, como así se ha demostrado en *Schizosaccharomyces pombe* entre AP-2 y la clatrina (de León et al., 2016). (2) A continuación, llegarán los elementos de la cubierta intermedia, que serán de especial relevancia para interactuar con los cargos y con la clatrina. (3) Por último, la cubierta tardía mediará la estabilización de toda la cubierta así como la interacción con factores reguladores de la actina.

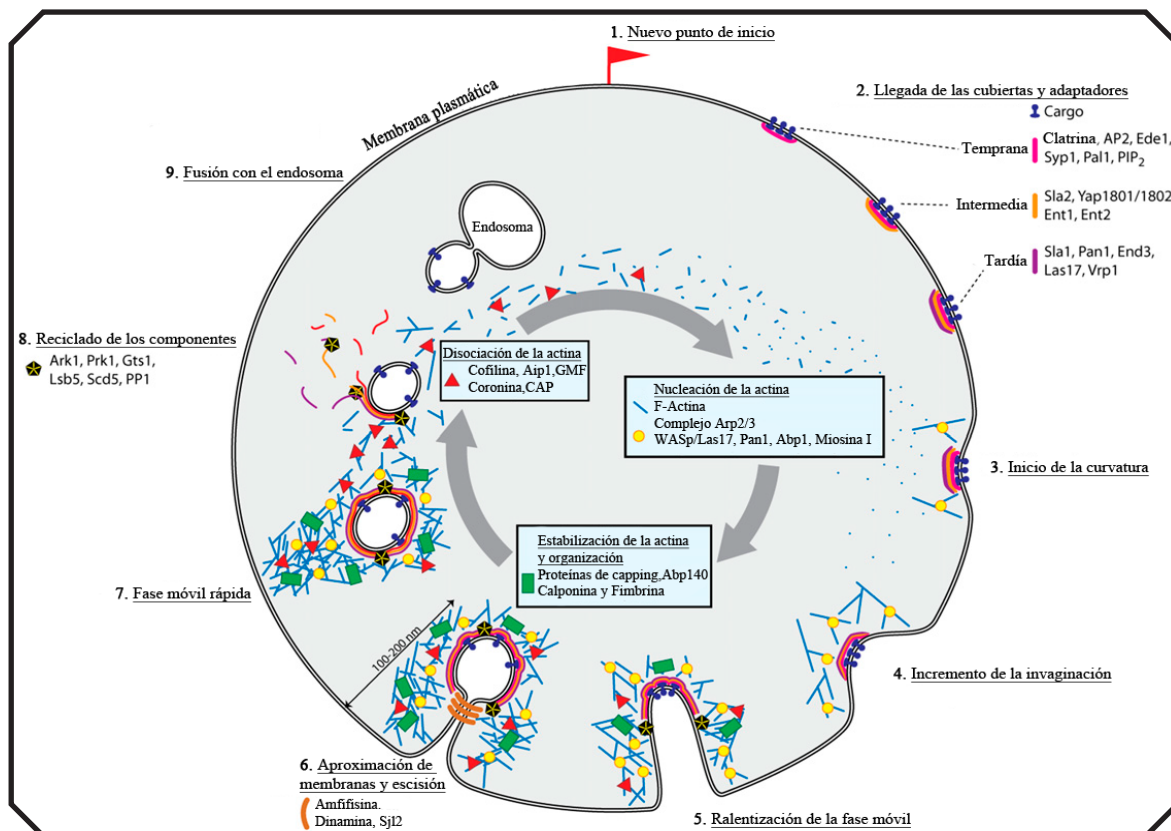


Figura 9. Endocitosis mediada por clatrina. Representación de un evento de endocitosis mediado por clatrina. Nótese la implicación de múltiples proteínas y su reciclaje para un posterior evento de endocitosis. Adaptado de Goode et al., 2015.

La **fase móvil** comienza con el reclutamiento de la actina, que conformará una red tridimensional conocida como parche de actina. El proceso comenzará con el ensamblaje del complejo promotor de actina Arp2/3. Además, todo este proceso se verá regulado por los llamados factores promotores de la nucleación de la actina. Una vez se han formado los filamentos de actina, para impedir su despolimerización, los extremos son cubiertos por el complejo 'capping'. Adicionalmente, otras proteínas mediarán el entrelazado de los filamentos para generar la red. Esta red, junto con las miosinas, generará la fuerza deformadora que permitirá la invaginación controlada de la membrana. Por último, un proceso coordinado donde participarán fosfatasas, anfifisinas y endofilinas mediará la escisión final de la vesícula.

Una vez formada la vesícula, tiene lugar la **fase de disolución** donde hay una despolimerización de actina y eliminación de la cubierta, permitiendo así el reciclado de los elementos. Por un lado, cofilina, coronina y profilina participarán en la despolimerización de actina, y por otro lado, las quinasas y fosfatasas desestabilizarán los componentes de la cubierta hasta escindirla. Para una revisión más detallada ver **Figura 9** y referencia (Goode et al., 2015).

4.5.4. Control de calidad y reciclado

Las vesículas generadas por la endocitosis, que contendrán la proteína cargo transmembrana, se fusionarán con los endosomas tempranos. Desde aquí, las proteínas pueden volver directamente hacia la MP, y de hecho se cree que es la vía por defecto elegida por muchas proteínas en ausencia de señales de degradación. También pueden llegar de nuevo al TGN gracias al complejo del retrómero, desde donde volverán a ser enviadas a la MP. Y por último, las proteínas pueden ser enviadas para degradación en la vacuola/lisosoma a través de la ruta de maduración del cuerpo multivesicular (MVB = 'Multi-vesicular Body'), proceso mediado por el complejo del ESCRT. En algunas células de mamíferos se ha descrito un transporte directo desde el lisosoma a la MP, es lo que se conoce como los exosomas. Revisado en MacDonald and Piper, 2016.

Aunque el esquema general y las funciones principales desarrolladas por el sistema de endomembranas están conservados en la escala evolutiva, cada organismo e incluso cada tipo celular presenta un sistema con diferente grado de complejidad. Especialmente, la zona más variable en número y especialización de compartimentos es la que se encuentra entre el Golgi y la vacuola/lisosoma, que entre otras cosas mediará el reciclaje proteico. Así, en mamíferos existe gran variedad de endosomas que desarrollan funciones específicas, como los endosomas de reciclaje, endosomas tempranos y tardíos, exosomas y lisosomas (Hierro et al., 2015; Spang, 2015). Sin embargo, en otros organismos dicha complejidad puede ser menor. Así, el modelo de orgánulos para *S. cerevisiae* hace una década definía únicamente endosoma temprano y endosoma tardío (o compartimento prevacuolar) entre la vacuola y el TGN (Bowers and Stevens, 2005). Y al parecer, este sistema puede ser aún más reducido, como se ha descrito en las últimas actualizaciones del sistema endomembranoso de *S. cerevisiae* (Day et al., 2018) y en el del modelo de embriófitos *Arabidopsis thaliana* (Viotti et al., 2010). Más concretamente, en *S. cerevisiae* existiría un aparato de Golgi y un compartimento prevacuolar (PVC/MVB) estable. Entre estos dos compartimentos y la MP, existiría una estructura extremadamente dinámica, donde las proteínas, llegando de múltiples orgánulos, serían segregadas en diferentes dominios para después ser transportadas a otros orgánulos. Por lo tanto, un mismo compartimento dirigirá la clasificación y el transporte tanto de las proteínas de nueva síntesis provenientes del Golgi como el de las proteínas que sufrieron endocitosis en la

MP. Así en este compartimento de *S. cerevisiae*, que denominaremos TGN/EE o simplemente TGN, convergerán tanto la ruta secretora como la endocítica (Day et al., 2018) (**Figura 10**).

Como se describió para el retículo endoplásmico, en el entorno de la MP y del compartimento TGN/EE, también existen mecanismos de control de calidad de las proteínas. Así, además de las señales extracelulares e internas generales, estos puntos de control de calidad van a ser claves para permitir el reciclado de las proteínas o enviarlas a degradación. En este sentido, en mamíferos se ha descrito un mecanismo de control de calidad en el que, al igual que ocurre para proteínas citosólicas, los dominios citoplásmicos alterados de las proteínas transmembrana son reconocidos por las chaperonas citoplásmicas en múltiples puntos de la ruta secretora y endocítica, incluida la MP. Este reconocimiento atrae a la ubiquitín ligasa CHIP que media la ubiquitinación del cargo, permitiendo su incorporación en la ruta de degradación hacia el lisosoma. Este mecanismo no se ha descrito en *S. cerevisiae*, sin embargo, se ha descrito un mecanismo de control de calidad independiente de chaperonas, que parece común para muchas de las permeasas propias de la MP. Es el sistema 'LID-degron' descrito en la permeasa de uracilo Fur4 (Keener and Babst, 2013). Según este sistema, un dominio propio de la permeasa conocido como LID (loop internal domain) es capaz de reconocer tanto señales de la actividad de la propia proteína como errores en su plegamiento, y en su caso permitirá la exposición del dominio degron hacia el citoplasma. Este último es reconocido por la maquinaria de ubiquitinación, permitiendo ubiquitinar la permeasa y dirigiéndola así a degradación en la vacuola. Revisado en Babst, 2014.

El rol de la ubiquitinación en el envío de las proteínas transmembrana a degradar en la vacuola/lisosoma está bien documentado, por lo tanto, el concepto de eliminación de la ubiquitina para permitir el reciclaje del cargo es algo plausible. Existen pruebas a favor de este concepto, donde la acción de enzimas desubiquitinasas, eliminando residuos de Ub, permiten el reciclado de proteínas a nivel endosomal, tanto en mamíferos, con el receptor EGFR (Row et al., 2006), como en levaduras, con el transportador de hierro Frt1-Fet3 o el transportador de azúcar Jen1 (Becuwe et al., 2012; Felice et al., 2005). Una vez desubiquitinadas, en los endosomas las proteínas pueden ser enviadas de nuevo a MP mediante diferentes rutas de reciclaje. En levaduras son importantes para el reciclaje

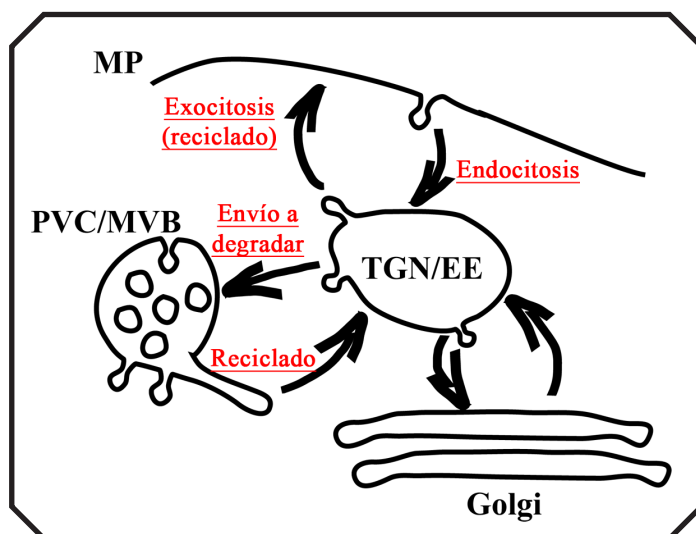


Figura 10. Modelo actualizado del compartimento TGN/EE en *S. cerevisiae*.

Los datos presentados por el grupo del Profesor Benjamin S. Glick apoyan la hipótesis de un sistema membranoso más simple en *S. cerevisiae* (Day et al., 2018). Así, en esta especie un único compartimento, el TGN/EE, mediaría funciones de intercambio con el Golgi, exocitosis, y reciclado o envío a degradación del material endocitado en la MP. TGN, red *trans*-Golgi; EE, endosoma temprano; PVC, compartimento prevacuolar; MVB, cuerpo multivesicular; MP, membrana plasmática.

los complejos adaptadores AP-1 y Ent3/5 y probablemente Gga1/2 a nivel de los endosomas tempranos, así como el complejo del retrómero en los endosomas tardíos. Así, en *S. cerevisiae* se reciclan SNAREs como Snc1 y Tlg1 (Chen et al., 2005; Valdez-Taubas and Pelham, 2005), la proteasa Ste13 (Foote and Nothwehr, 2006), permeasas como Gap1 y Can1 (O'Donnell et al., 2010; Shi et al., 2011), o la quitín sintasa Chs3 (Arcones et al., 2016; Valdivia et al., 2002).

4.5.5. Complejos adaptadores del tráfico intracelular en el TGN/EE

Cubierta de clatrina

Ya en la década de los 60s, varios grupos de investigadores que trataban de entender la endocitosis de receptores usando microscopía electrónica de transmisión, observaron estructuras vesiculares próximas a la MP con una morfología regular muy concreta (**Figura 11**). Pero no será hasta el trabajo desarrollado por Barbara Pearse cuando se identifique la naturaleza proteica que recubría estas vesículas, describiéndose en primer lugar la cadena pesada de la clatrina (Pearse, 1975). En paralelo se determinó que la clatrina conformaba una esfera hecha a base de hexágonos y pentágonos que cubre por completo la vesícula a modo de balón de fútbol (Kanaseki and Kadota, 1969), donde la subunidad que se repetía es una estructura con tres patas, a la que se denominó

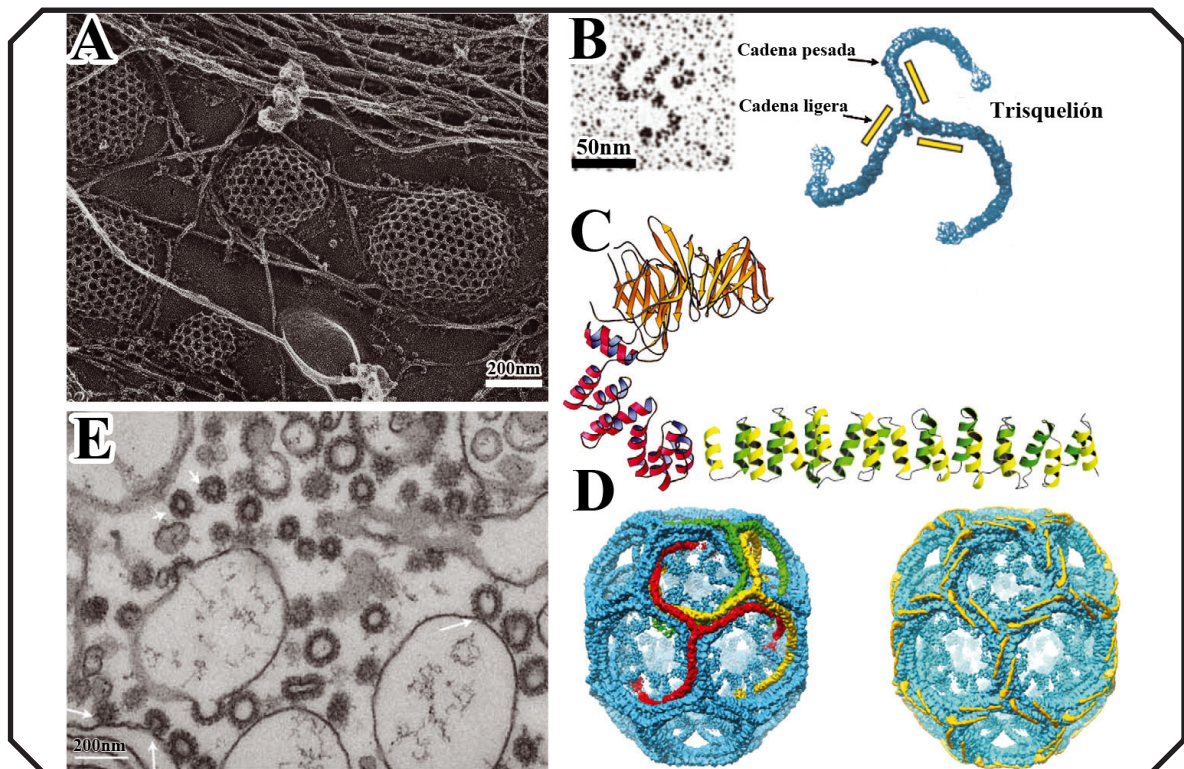


Figura 11. Vesículas recubiertas por clatrina. **A)** Imagen de microscopía electrónica de barrido del laboratorio de John Heuser. Se pueden ver las vesículas de clatrina emergiendo de la membrana plasmática hacia el citoplasma. **B)** A la izquierda una imagen de microscopía electrónica de un trisquelión de clatrina (Ungewickell and Branton, 1981), a la derecha una representación del trisquelión con 3 cadenas pesadas y 3 ligeras de clatrina. **C)** Representación de la estructura tridimensional de brazo y pie de una cadena pesada de clatrina. **D)** Representación de un barril hexagonal de clatrina. A la izquierda se resalta la unión entre las cadenas pesadas de los trisqueliones, y a la derecha se indica la disposición de las cadenas ligeras en amarillo. **E)** Imagen de microscopía electrónica de vesículas de clatrina que emergen a partir de liposomas purificados (Dannhauser and Ungewickell, 2012). Adaptado de Robinson, 2015.

trisquelión. El trisquelión se compone de un trímero de cadenas pesadas (Chc1) unidas de forma radial por su extremo C-terminal, al cual se unen de forma no covalente otras tres cadenas ligeras (Clc1) en paralelo (Ungewickell and Branton, 1981). Con el paso de los años, gracias al desarrollo de las técnicas de cristalografía de rayos-x y a la crio-microscopía electrónica, se terminó por obtener la estructura completa de una cubierta de clatrina (Fotin et al., 2004). La clatrina parece ser esencial para la viabilidad de animales y plantas (Bazinet et al., 1993; Kitakura et al., 2011). Sin embargo, algunos organismos unicelulares y líneas celulares son viables en ausencia de la clatrina, aunque su supervivencia está drásticamente comprometida (Payne and Schekman, 1985). El gen de la cadena pesada de la clatrina está conservada a lo largo del dominio eucariota, con pequeñas excepciones como el clado fúngico parasitario Microsporidia (Barlow et al., 2014), lo cual indicaría que la clatrina es una antigua proteína que seguramente hubiera estado presente en el último ancestro eucariota común (LECA). Sin embargo, la unión directa con las membranas y proteínas cargo, no parecía estar mediada directamente por la clatrina. En esta línea, junto a las cadenas de clatrina se aisló una serie de proteínas llamadas polipéptidos de ensamblaje (assembly polypeptides = APs), que ayudaban a la conformación de la cubierta *in vitro* y que más tarde se vio que son de vital importancia para el reconocimiento del cargo y la vesiculación *in vivo* (Zaremba and Keen, 1983). Para una revisión completa de la historia de la investigación en las vesículas de clatrina ir a (Robinson, 2015).

Complejos proteicos adaptadores AP

Los complejos adaptadores AP-1 y AP-2 se descubrieron, el primero localizado por toda la célula, principalmente en regiones próximas al TGN y endosomas, y el segundo en zonas adyacentes a la MP, siendo este después relacionado con la CME (Keen, 1987; Robinson, 1987). Posteriormente, se demostró que estos complejos adaptadores eran los encargados de reconocer regiones específicas en las proteínas que iban a ser transportadas, funcionando así como auténticos nexos entre la cubierta de clatrina y el cargo (Janvier et al., 2003; Ohno et al., 1995). A partir de estos dos complejos, fundamentalmente por análisis de homología de secuencia o estructura, se han descrito hasta cinco complejos proteicos adaptadores AP. Al parecer, los cinco complejos estaban presentes en LECA, pero en múltiples linajes evolutivos se ha perdido uno o varios de los complejos. Así, hay ejemplos de pérdida de cada uno de los complejos adaptadores excepto de **AP-1**. Mientras que la presencia de **AP-2** y **AP-3** es casi ubicua en el dominio eucariota, **AP-4** y **AP-5** ha desaparecido en varios linajes, como es el caso de la mayoría de los hongos (Barlow et al., 2014; Boehm and Bonifacino, 2001).

Estructuralmente los complejos adaptadores son heterotetrámeros compuestos por dos subunidades o adaptinas grandes, una subunidad mediana y una pequeña (**Figura 12**) (Boehm and Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011). Estos complejos funcionan como adaptadores de cargo que reclutan las cubiertas al punto de vesiculación en diferentes localizaciones de las rutas secretoras y endocíticas (Boehm and Bonifacino, 2001). En los últimos años se han descrito muchos detalles sobre el mecanismo de acción de estos complejos. Así, se sabe que únicamente se unen a las membranas una vez se ha conformado el heterotetrámero por completo (Canagarajah et al., 2013). Asimismo, se ha visto que lejos de ser elementos inertes, participan activamente regulando varios pasos del proceso de vesiculación, como la unión secuencial con la GTPasa y los fosfoinosítidos, así como la acumulación del cargo (Canagarajah et al., 2013; Paczkowski et al., 2015). AP-1 participa en la formación de cubiertas de clatrina que median la segregación de proteínas entre el TGN y los endosomas, con implicaciones a su vez en el transporte hacia la MP (Nakatsu et al., 2014) (**Figura 6**). AP-2 participa en la endocitosis mediada por clatrina (Boehm and Bonifacino, 2001). AP-3 media el

transporte desde el TGN/endosoma temprano (EE) hacia el lisosoma/vacuola. AP-4 está implicado en el transporte desde el TGN hacia los endosomas y la superficie celular (Bonifacino, 2014). Y el recientemente descrito AP-5 parece tener un papel similar al complejo del retrómero en el transporte desde los endosomas tardíos hacia el TGN (Hirst et al., 2011, 2018). Las funciones de AP-1 y AP-2 están únicamente ligadas a la clatrina, en cambio, el papel de AP-3 en *S. cerevisiae* es independiente de la clatrina (Simpson et al., 1996). En mamíferos, algunas de sus funciones están ligadas a la clatrina, mientras que otras parecen ser mediadas por una cubierta alternativa, Vps41 (Asensio et al., 2013; Dell'Angelica et al., 1998). AP-4 y AP-5 parecen funcionar siempre independientemente de la clatrina, y para AP-5 se ha descrito una estructura a modo de cubierta en mamíferos, formada por las proteínas Spg11 y Spg15 (Hirst et al., 2011).

En el caso de la levadura de gemación, el complejo AP-1 está formado por dos adaptinas mayores γ (Apl4) y β 1 (Apl2), dos subunidades alternativas medianas μ 1 (Apm1/Apm2) y la pequeña σ (Aps1). Las subunidades mayores unidas favorecen una cavidad en su zona N-terminal donde se unen las adaptinas μ 1 y σ 1. También las subunidades mayores, por el extremo carboxilo presentan unos apéndices que cambian de posición según las interacciones que tenga el complejo con otros ligandos. En la región bisagra que une los apéndices con el resto del complejo, están los dominios de interacción con la clatrina. Este complejo, en mamíferos, media la segregación de proteínas entre las regiones del TGN y endosomas tempranos (EE = early endosomes) (Boehm and Bonifacino, 2001), lo que en *S. cerevisiae* se correspondería con el compartimento único TGN/EE (Day et al., 2018). Para conseguirlo, AP-1 tiene que pasar de una conformación cerrada a una abierta, donde los dominios de unión con los cargos y la clatrina quedan expuestos. Así, AP-1 es reclutado a las membranas ricas en PI4P, y allí se unirá a dos moléculas de la GTPasa Arf1, lo cual permitirá la unión de múltiples complejos AP-1 a la zona y estabilizará la conformación abierta. Ya en esta conformación, los cargos serán concentrados, y gracias a la exposición de los dominios de interacción con la clatrina, tendrá lugar el ensamblaje secuencial de la cubierta (Canagarajah et al., 2013; Paczkowski et al., 2015).

En *S. cerevisiae*, AP-1 media el reciclado de las proteasas Kex2 (Ha et al., 2003) y Ste13 (Foote

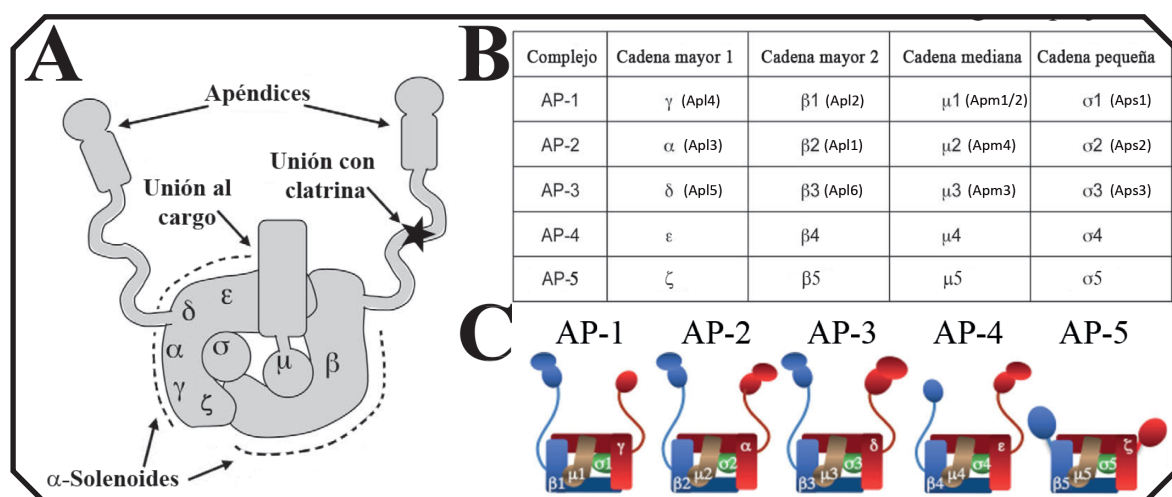


Figura 12. Complejos proteicos adaptadores AP. A) Representación modélica de un complejo AP, sus distintas subunidades y sus dominios más relevantes. B) Tabla resumen de los complejos AP y el nombre de sus subunidades. Entre paréntesis el gen codificante en *S. cerevisiae*. C) Comparación de la estructura de cada uno de los complejos AP. Adaptado de Hirst et al., 2011; Canagarajah et al., 2013.

and Nothwehr, 2006), la SNARE Tlg1 (Yeung and Payne, 2001), la permeasa Gap1 (O'Donnell et al., 2010), la quitín sintasa Chs3 (Valdivia et al., 2002), la proteína de fusión Fus1 (Barfield et al., 2009) y la proteína priónica Pin2 (Ritz et al., 2014). Además participa en el transporte de la flipasa de fosfolípidos Drs2 (Liu et al., 2008); proteína relevante para el propio proceso de vesiculación de AP-1. En ausencia del complejo, las proteínas pierden su correcta localización en la región del TGN/EE pasando a localizarse preferentemente en la MP o en la vacuola.

Otros complejos adaptadores

Además de los adaptadores proteicos AP, en los últimos años se han descrito numerosos adaptadores, muchos de ellos monoméricos, que van a interactuar con GTPasas, cubiertas y cargos; participando en la segregación de estos últimos. Así, se ha descrito el papel del complejo **TSET**, un heterotetrámero que participa en la endocitosis dependiente de clatrina en plantas que, aunque no se ha conservado en todos los linajes, parece ser un complejo muy antiguo. La familia de las **muniscinas**, proteínas emparentadas con el complejo TSET, que parecen funcionar como adaptadores en la endocitosis en metazoos. Los adaptadores monoméricos con dominio PTB (phosphotyrosine-binding) como **Dab2** y **ARH**, que median la endocitosis del receptor de la lipoproteína LDL en mamíferos. El adaptador de metazoos **stonin-2**, el cual interactúa con el cargo synaptotagmin-1. Los adaptadores con dominio homólogo a la región N-terminal de las epsinas (**ENTH**) y los que poseen el dominio homólogo a la región N-terminal de AP180 (**ANTH**), ambos altamente conservados en la escala evolutiva, capaces de unirse a las SNAREs y mediar su transporte. También se han descrito las proteínas **GGAs**, que participan en el transporte de múltiples cargos en vesículas recubiertas de clatrina; aunque con una estructura bien conservada exclusivamente dentro del grupo de los Opisthokonta (Metazoos y Fungi), parte de su estructura está conservada a lo largo del dominio eucariota. En definitiva, según la hipótesis prevalente actual, la generación de genes parálogos y una posterior diferenciación en la función de estos parálogos (neofuncionalización), probablemente por la adquisición o pérdida de dominios o motivos conservados, ha generado una auténtica amalgama de complejos adaptadores. Este proceso no es exclusivo de los adaptadores, afectando también a las GTPasas, cubiertas, factores amarra, etc. Revisado en De Craene et al., 2012; Robinson, 2015; Rout and Field, 2017; Schlacht et al., 2014.

GGAs (Golgi-localized, Gamma-ear containing, Arf-binding proteins): Gga1 y Gga2

En la búsqueda de otros adaptadores con dominios homólogos a los complejos AP-1 se identificaron, incluso antes que el complejo AP-5, unos adaptadores de clatrina monoméricos denominados GGAs. El nombre deriva de las características básicas que los definen: localización en el Golgi, contienen un dominio γ -ear y se unen a las GTPasas de la familia Arf (GGA = Golgi-localized, Gamma-ear containing, Arf-binding proteins). Aunque su forma de interactuar con las proteínas no parece ser igual en metazoos que en hongos, su localización en el TGN-EE, su función de transporte hacia los compartimentos pre-vacuolares/endosomas tardíos, y su estructura global parece estar conservada (Bonifacino, 2004) (**Figura 6**). En mamíferos existen tres monómeros GGAs (GGA1, GGA2 y GGA3) y en *S. cerevisiae* dos (Gga1 y Gga2), que parecen presentar estructura y función muy similares.

Su estructura proteica está formada por un tándem de tres dominios conservados: VHS, GAT y GAE. El dominio **VHS** recibe ese nombre por ser un dominio conservado en otras 3 proteínas implicadas en el tráfico intracelular (Vps27, Hrs y Stam). En mamíferos, este dominio es fundamental

para el reconocimiento de los cargos a través de motivos DXXLL presentes en sus colas citosólicas. Sin embargo, en levaduras la unión con los cargos parece ser mediada principalmente por el dominio GAT. Este dominio se continúa con una cola rica en prolinas que rápidamente conecta con el dominio **GAT**. Este dominio interacciona con múltiples proteínas como Arf1-GFP, lo cual posibilita el reclutamiento de las GGAs a las membranas del TGN. Además, el dominio GAT es importante en levaduras para interactuar con los cargos ubiquitinados, al menos en el caso de Gap1, Fur4, Sit1 y Arn1 (Deng et al., 2009; Erpapazoglou et al., 2008; Scott et al., 2004). Aunque menos consensuado, es posible que en mamíferos este dominio también permita la interacción con cargos ubiquitinados (Bilodeau et al., 2004). Siguiendo con la estructura, hay una región larga y flexible a modo de bisagra. Esta **región bisagra** es importante para la función de la proteína, ya que presenta un dominio de unión a la clatrina. Por último, está el dominio **GAE** (homólogo al dominio 'ear' de la γ -adaptina de AP-1), que es capaz de interactuar con muchas proteínas accesorias que participan en procesos de vesiculación y fusión de vesículas. En *S. cerevisiae* se ha descrito la unión de las epsinas Ent3 y Ent5 al dominio GAE de Gga2 (Duncan et al., 2003). En plantas se han identificado proteínas similares a las GGAs, aunque estas carecen del dominio GAE, por lo que su función puede ser otra (De Craene et al., 2012).

Por lo tanto, las GGAs en levaduras asisten al transporte de varios cargos desde el TGN/EE hasta compartimentos pre-vacuolares. En su mayor parte, el reconocimiento es a través de la/s ubiquitina/s unida/s covalentemente al cargo. Sin embargo, otro tipo de señales, como dominios ácidos o fosforilaciones en las colas citosólicas de los cargos, parecen tener un papel relevante en el reconocimiento de cargos por las GGAs. Revisado en Bonifacino, 2004; De et al., 2013.

Epsinas en el TGN/EE: Ent3 y Ent5

En los últimos años, numerosas evidencias señalan a las proteínas de la familia de las epsinas como elementos importantes del tráfico mediado por vesículas de clatrina, tanto funcionando como adaptador de cargo, como regulando el propio proceso de vesiculación. Los dominios ENTH (Epsin N-Terminal Homology) son módulos de unión a fosfoinosítidos capaces de deformar membranas, presentes en las epsinas de mamíferos y en sus homólogos en múltiples linajes eucariotas, incluyendo *S. cerevisiae*, que tiene cinco (Ent1-5). En levaduras Ent3 y Ent5, ambas con dominios ENTH parcialmente diferentes (De Craene et al., 2012), desarrollan varios papeles en la maduración de las vesículas de clatrina en la región TGN/EE, tanto reclutando cargos como asistiendo a los adaptadores AP-1 y GGAs (Duncan and Payne, 2003) (**Figura 6**).

En cuanto a su función como adaptador de cargo, se ha visto que las proteínas con dominios ENTH y los dominios similares ANTH son de vital importancia en múltiples organismos para el transporte de proteínas SNARE (Chidambaram et al., 2004, 2008; Lee et al., 2007). Estudios en mamíferos y levaduras han determinado que esta unión entre proteínas de tipo epsina o similar y la SNARE es mediada por amplias regiones en vez de señales puntuales (Miller et al., 2007; Zimmermann et al., 2010). Se ha postulado que este tipo de reconocimiento permitiría asegurar el reclutamiento de la SNARE a la vesícula sin necesidad de competir con otros cargos, que serían reconocidos por otros adaptadores y a través de señales puntuales (Robinson, 2015). Además de funcionar como adaptador de cargos, estas proteínas desempeñan funciones en el proceso de vesiculación. Así, participan en la deformación de la membrana o en la maduración de la vesícula interactuando con otros adaptadores como AP-1 y GGAs (Hung and Duncan, 2016a; Miller et al., 2015).

En cuanto a su estructura, Ent3 desde el extremo N-terminal, presenta un dominio ENTH-A, tres dominios 'γ-ear' y un dominio vestigial de unión a la clatrina en su región C-terminal. Ent5 contiene otro dominio ENTH-A un poco divergente, dos dominios de unión 'γ-ear' y dos regiones consenso de unión a la clatrina (De Craene et al., 2012; Duncan and Payne, 2003).

El análisis genético ha revelado que la delección conjunta de estos dos genes (*ent3Δ ent5Δ*) genera defectos en el tráfico de SNAREs, carboxipeptidasas vacuolares (CPS y CPY), cargos ubiquitinados de la ruta del MVB y otros cargos específicos como la caseína quinasa Yck2 y la quitina sintasa Chs3. Sin embargo, Ent3 y Ent5 presentan funciones específicas derivadas de la diferencia en sus dominios. Así, Ent3 asiste al transporte mediado por Gga2 en el TGN/EE y es el único capaz de unirse directamente a las SNAREs endosomales Vti1, Pep12 y Syn8. Ent5 parece tener un papel en la maduración de la vesícula interaccionando con Gga2, AP-1 y la clatrina, y presenta interacción con Chs3, no así con las SNAREs. Revisado en Duncan and Payne, 2003; Hung and Duncan, 2016; Morvan et al., 2015.

Coordinación entre adaptadores

El reclutamiento de todos estos adaptadores descritos no tiene lugar de forma aleatoria, sino que es un proceso coordinado, que asegura que unas proteínas se carguen en una vesícula concreta con un destino concreto y otras en otra. Así, en el TGN/EE existe un proceso secuencial de reclutamiento de proteínas adaptadoras, el cual va a posibilitar la generación de varios tipos de vesículas. De este modo, usando *S. cerevisiae* como modelo, varios grupos han contribuido a definir la secuencia de adaptadores que tiene lugar en el TGN/EE para generar las vesículas que se dirigen específicamente al compartimento prevacuolar (PVC)/endosoma tardío (LE), a la vacuola o a la MP. Así, existen dos olas de reclutamiento de la clatrina que se corresponderían con la generación de al menos dos tipos de vesículas. La primera ola va acompañada de Gga2, Ent3 y una parte minoritaria de Ent5, mientras que la segunda ola se corresponde con un pico de reclutamiento de la mayoría de Ent5 y de AP-1 (Daboussi et al., 2012). En concordancia con esto, las GGAs reclutan a la epsina Ent3, la cual es capaz de concentrar a las SNAREs requeridas para el tráfico endosomal. Por otro lado, las GGAs reclutan cargos adicionales a la vesícula naciente, y en su conjunto ambos adaptadores, interaccionando con la clatrina, generarán las vesículas dirigidas a los endosomas (Black and Pelham, 2000; Chidambaram et al., 2008). Se ha visto que la síntesis de PIP4 en el TGN/EE es vital para la llegada de los adaptadores y consiguiente vesiculación. Esta síntesis es mediada por la quinasa Pik1. Al parecer, Gga2, aun cuando los niveles de PI4P son relativamente bajos, es capaz de reclutarse a la membrana, lugar donde ayudará al reclutamiento masivo de la quinasa Pik1, lo cual promoverá un incremento exponencial de los niveles de PI4P. Este incremento de PI4P permitirá la correcta maduración del proceso de reclutamiento de adaptadores y, por consiguiente, la correcta segregación de las proteínas en los diferentes compartimentos (Daboussi et al., 2012). En los últimos años, nuevos procesos de regulación se han descrito en este proceso secuencial, así, se ha descrito una interacción funcional entre Gga2 y Ent5 que posibilita la duración correcta del proceso (Hung and Duncan, 2016).

Por otro lado, conviene recordar que existe un continuo trasiego de vesículas dentro del compartimento TGN/EE. Como se vio, los complejos adaptadores AP, así como las GGAs y las epsinas participan en la segregación de proteínas, ya sea de forma dependiente de la clatrina como independientemente de ella (Hierro et al., 2015; Spang, 2015). En el transporte retrógrado hacia el TGN no solo participan estos adaptadores ampliamente descritos, sino que también funcionan

otros complejos que van a ayudar a reciclar múltiples proteínas en distintos niveles de la ruta endocítica. En este sentido, cabe destacar el papel de las nexinas SNX4/41/42 (sorting nexin) y el complejo del retrómero, ambos conservados en los linajes eucariotas. Estos complejos van a mediar la segregación de proteínas en intermediarios tubulares de transporte, que van a contactar con las membranas del TGN, reabasteciéndolo de proteínas recicladas. Para una revisión más detallada tanto del proceso como de sus actores acudir a las revisiones (Burd and Cullen, 2014; Hierro et al., 2015). En este contexto no hay que olvidar el reciente modelo en *S. cerevisiae* que postula una continua segregación de proteínas entre las diferentes regiones de lo que en realidad sería un único compartimento que va madurando en el tiempo, el TGN/EE (Day et al., 2018). La participación de estos complejos en las diferentes regiones del sistema de endomembranas es lo que determinará el envío a degradar en la vacuola o el reciclaje, ya sea a nivel del TGN/EE o desde el PVC/LE.

5. EL EXÓMERO

Antecedentes

Antes incluso de conocerse la conformación del exómero como complejo proteico, varias de sus subunidades, Chs5 y Chs6, habían sido descritas como proteínas con importancia tanto en la síntesis de quitina (Bulawa, 1993; Roncero et al., 1988; Santos et al., 1997) como en el proceso de conjugación de *S. cerevisiae* (Santos et al., 1997). Además, existían evidencias directas que implicaban a dichas proteínas en el transporte de Chs3 (Santos and Snyder, 1997; Ziman et al., 1998), la subunidad catalítica de la quitín sintasa III (Bulawa et al., 1986; Valdivieso et al., 1991), así como en el transporte de Fus1 (Santos and Snyder, 2003), proteína implicada en la conjugación de *S. cerevisiae* (Trueheart et al., 1987).

Un complejo proteico asociado a las membranas del TGN/EE

El exómero se describió como complejo proteico algo más tarde, demostrando que funcionaba como un efector de la GTPasa Arf1 en el TGN, y que era imprescindible para el transporte de la quitín sintasa Chs3 hasta la MP (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Estructuralmente, el exómero está conformado por dos copias de la proteína principal Chs5 y dos copias de cualquiera de los miembros de cuatro proteínas parálogas conocidas como ChAPs (Chs5 and Arf1 binding proteins): Chs6, Bud7, Bch1 y Bch2 (Paczkowski et al., 2012) (**Figura 13 B**).

Chs5 presenta una región N-terminal característica de 300 aa', presente solo en sus homólogos, y capaz de mediar las funciones descritas para la proteína completa Chs5 (Martín-García et al., 2011) (**Figura 13 A y B**). Desde el extremo N-terminal está compuesta por un motivo en hoja- β antiparalela que media su dimerización, seguida de una α -hélice que conecta con el dominio FBE, este último capaz de interactuar con los ChAPs y Arf1. El dominio FBE se compone de un dominio FN3 (FibroNectin type III) y otro BRCT (BR^east C-Terminal). Se cree que el origen de este dominio FBE está en reordenamientos de secuencia ya que Chs5 es la única proteína descrita con ambos dominios juntos (Martín-García et al., 2011; Paczkowski et al., 2012). Los dominios FN3 se encuentran en proteínas de superficie celular (Bateman and Chothia, 1996), mientras que los dominios BRCT se encuentran en proteínas de localización nuclear que median procesos de respuesta a daño del

ADN (Huyton et al., 2000). Por su parte, los ChAPs presentan hasta 5 dominios tetratricopéptidos (TPRs), 4 en la zona central y 1 en la zona C-terminal (Rockenbauch et al., 2012) (**Figura 13 B y C**). Estos dominios, compuestos por 34 aa' formando varias repeticiones, están presentes en otras proteínas y son importantes para la interacción proteína-proteína (Blatch and Lässle, 1999). Los dominios TRPs centrales son necesarios para la interacción con Chs5 y entre ChAPs. El TRP terminal es necesario para un eficiente reclutamiento de los ChAPs al TGN/EE (Rockenbauch et al., 2012). Así, dos moléculas de Chs5 interaccionarán por su zona N-terminal conformando una estructura en β -sándwich (Richardson and Fromme, 2013). Conformado el homodímero, este interaccionará a través de su dominio FBE tanto con un dímero de ChAPs como con dos moléculas de Arf1-GTP (Paczkowski et al., 2012; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006) (**Figura 13 D**). Además de interaccionar con Arf1-GTP y la membrana lipídica, los ChAPs median la interacción con los cargos del exómero (Paczkowski et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006) (**Figura 13 D**).

Una característica interesante del exómero, es que es capaz de incrementar la capacidad intrínseca que tiene Arf1-GTP para deformar membranas y generar vesículas, siendo esto posible gracias a un dominio presente de forma exclusiva en los ChAPs Bud7 y Bch1 (Paczkowski and Fromme, 2014). En cambio, los ChAPs Chs6 y Bch2, que carecen de este dominio, parecen tener un papel más relevante en el reconocimiento de cargos (Huranova et al., 2016; Paczkowski and Fromme, 2014) (**Figura 13 D**). Por otro lado, el exómero, a diferencia de los complejos AP y COPI que se reclutan en bloque, se ensambla secuencialmente a la membrana. De esta forma, se ha descrito la dinámica de reclutamiento a la membrana del TGN/EE de las diferentes subunidades, además de la capacidad de cada subunidad para estabilizar el complejo en dichas membranas (Huranova et al., 2016). Así, primero se reclutaría Chs5 a las membranas a través de Arf1-GFP. Seguidamente llegarían Chs6, y probablemente Bch2, por su alta afinidad con Chs5. Y por último, Bch1 y Bud7 se incorporarían estabilizando los complejos en la membrana. Los cargos también parecen desarrollar un papel activo en la estabilización del complejo a las membranas (Huranova et al., 2016). Sin embargo, no se conoce exactamente ni el tipo ni el número de complejos del exómero que se ensamblan en una vesícula.

La naturaleza de este complejo ha sido ampliamente discutida. Así, se ha descrito que podría funcionar como una cubierta, de forma similar a COPI/COPII. Esta hipótesis tiene a su favor que el complejo es capaz de unirse directamente a una GTPasa y a los cargos (Trautwein et al., 2006), y en contra que no es capaz de deformar membranas de liposomas por sí mismo (Wang et al., 2006). Por lo tanto, el exómero funcionaría como una plataforma donde se reclutan determinados cargos que luego serían incluidos en algún tipo de vesícula específica, actuando así como un remodelador del TGN (Spang, 2015). Por otro lado, el exómero podría verse como un adaptador de cargo del tipo de los complejos AP. Estos complejos, al igual que el exómero, reclutan los cargos en vesículas, pero son incapaces de deformar membranas por sí mismos. De hecho, la región N-terminal de Chs5 se pliega con una estructura tridimensional similar a los apéndices de las adaptinas mayores de los complejos AP y de COPI (Paczkowski et al., 2012, 2015). Por lo tanto, hasta el momento, se puede afirmar que el exómero es un complejo proteico con características parciales de cubierta y de adaptador de cargo, que se recluta a las membranas del TGN/EE, y como efector de Arf1-GFP media el transporte de proteínas hacia la MP (Huranova et al., 2016; Paczkowski et al., 2015; Spang, 2015) (**Figura 6**) (**Figura 13**).

Los cargos del exómero

Este complejo media el transporte de un pequeño grupo de proteínas transmembrana desde el TGN/EE hasta la MP. Así, además de mediar el transporte de la quitín sintasa Chs3 (Santos and Snyder, 1997; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006), también media el transporte de la proteína de conjugación Fus1 (Barfield et al., 2009; Santos and Snyder, 2003), y Pin2, una proteína con dominio priónico pero de función desconocida (Ritz et al., 2014) (**Figura 13 E**). Estas proteínas comparten una distribución fuertemente polarizada en la MP. Así, Chs3 y Pin2, durante el ciclo vegetativo se concentran en las yemas incipientes y el cuello durante citocinesis (Ritz et al., 2014; Zanolari et al., 2011). Fus1 se concentra en la punta de la proyección durante el proceso de conjugación (Santos and Snyder, 2003).

A pesar de ser todas ellas proteínas con dominios transmembrana, su estructura es muy dispar: presentan de 1 hasta 6 dominios transmembrana y topológicamente son de tipo I o II. Pese a los esfuerzos por encontrar secuencias de reconocimiento para el exómero en sus cargos, no se ha

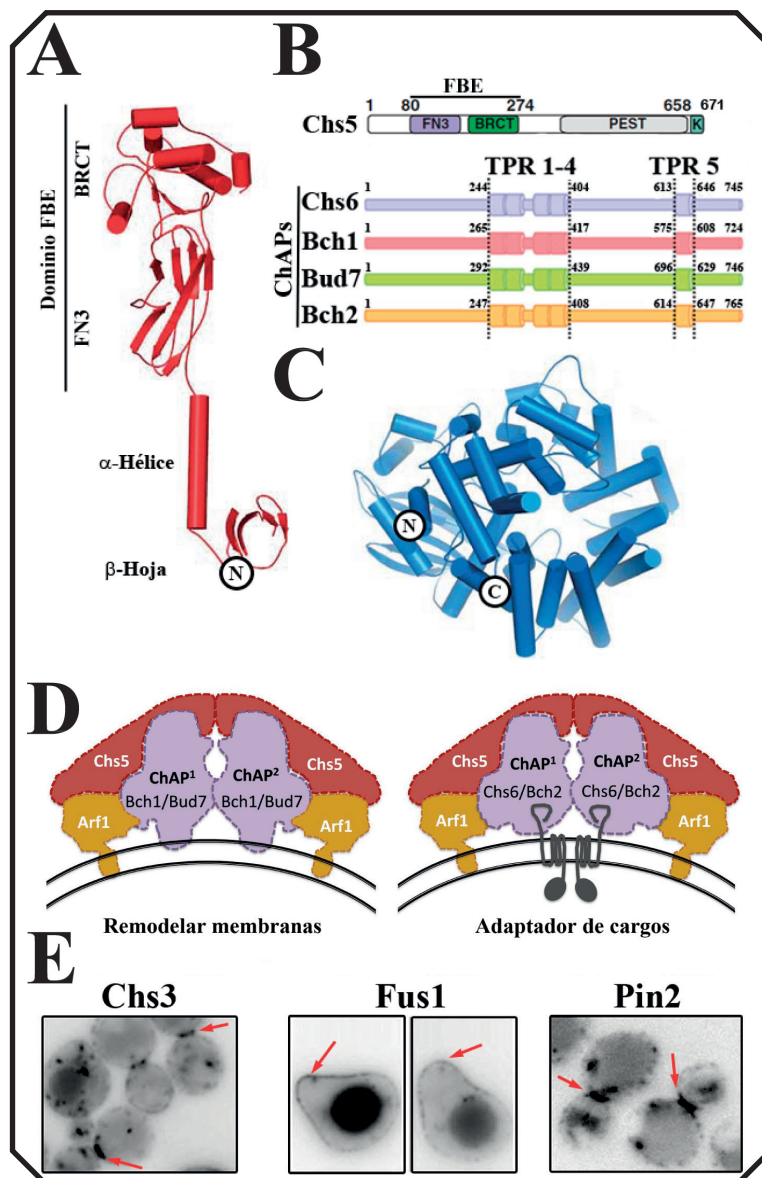


Figura 13. El complejo del exómero en *S. cerevisiae*. **A)** Representación de la estructura tridimensional de los 300 primeros aminoácidos de la proteína Chs5 (Paczkowski et al., 2012). **B)** Representación de la secuencia lineal y dominios de Chs5 y los ChAPs. Adaptado de Paczkowski et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012. **C)** Representación de la estructura tridimensional del ChAP Chs6 (Paczkowski et al., 2012). **D)** Representación del exómero ensamblado en las membranas del TGN/EE e interactuando con 2 moléculas de Arf1. A la izquierda un exómero conformado por los ChAPs Bch1/Bud7, capaz de remodelar membranas. A la derecha un exómero con los ChAPs Bch2/Chs6, con función de adaptador de cargo. **E)** Imágenes de microscopía de fluorescencia de una cepa silvestre donde se observa la localización polarizada de los cargos *bona fide* del exómero. Nota: Fus1 se expresa solo en conjugación y se localiza en la punta del 'shmoo'.

encontrado ninguna señal concreta compartida. En Chs3 hay regiones de interacción en las colas citosólicas N y C-terminal (Rockenbauch et al., 2012; Weiskoff and Fromme, 2014); en Fus1 hay una señal peptídica importante, pero que no está presente en el resto de cargos (Barfield et al., 2009); y en Pin2 hay una región en la cola C-terminal citosólica capaz de interactuar con el exómero (Ritz et al., 2014). Hipotéticamente, el exómero sería capaz de reconocer en los cargos regiones con una conformación concreta o incluso estados concretos de oligomerización proteica (Spang, 2015). A favor de esta hipótesis, se sabe que Chs3 precisa de una correcta oligomerización para poder llegar hasta la MP (Sacristan et al., 2013), así como que Pin2 en determinadas ocasiones forma agregados en el TGN/EE (Ritz et al., 2014). A pesar de no tener un dominio de reconocimiento común, todos los cargos comparten una localización polarizada y una masiva retención en el TGN/EE en ausencia del exómero. Además, tienen en común una alta regulación post-traducciona que pudiera ser de importancia para su interacción con el exómero. Así, Chs3 en vez de ser degradado tras desempeñar su función, cicla de una forma dependiente del ciclo celular entre la MP y el TGN/EE. Además, en respuesta a varios estreses, la célula es capaz de incrementar su transporte a la MP (Arcones et al., 2016; Chuang and Schekman, 1996; Sacristan et al., 2013; Zanolari et al., 2011). Por su parte, Pin2 también cicla dependiente del ciclo celular y es capaz de responder a estímulos tóxicos como el exceso de litio (Ritz et al., 2014). Para mantener su correcta localización, estas proteínas presentan múltiples modificaciones post-traduccionales incluyendo N-glicosilación, fosforilación, palmitoilación y ubiquitinación (Arcones et al., 2016; Ritz et al., 2014; Sacristan et al., 2013).

Otro aspecto interesante a remarcar, es que la retención de los cargos en el TGN/EE en ausencia del exómero es dependiente del complejo AP-1 (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Valdivia et al., 2002). Así, en ausencia del complejo AP-1 o inhibiendo la interacción del cargo con AP-1 (Starr et al., 2012), el cargo es capaz de alcanzar la MP en ausencia del exómero que es lo que se conoce como la ruta alternativa. Sin embargo, la distribución que toman los cargos en la MP al seguir esta vía pierde la fuerte polarización que tiene lugar cuando está presente el exómero.

Otras funciones y conservación del exómero

La ausencia de síntesis de quitina de los mutantes del exómero *chs5Δ*, *chs6Δ* y el mutante doble *bch1Δ bud7Δ* ha sido atribuida al bloqueo de Chs3 en el TGN/EE (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). De la misma forma, el problema en conjugación que presenta el mutante *chs5Δ* y el mutante doble *bch1Δ bud7Δ* se atribuye al bloqueo de Fus1 en el TGN/EE (Barfield et al., 2009). Por otro lado, diferentes mutantes del exómero, generan problemas en el patrón de gemación (Trautwein et al., 2006) así como hipersensibilidad a cationes tóxicos como litio, sodio, higromicina y amonio (Fell et al., 2011; Rockenbauch et al., 2012; Trautwein et al., 2006). Sin embargo, no se ha descrito la retención de un cargo proteico que explique esta hipersensibilidad en los mutantes.

Es posible que el exómero medie el transporte hacia la MP de otras proteínas implicadas en los fenotipos que aún están por explorar. Sin embargo, y teniendo en cuenta que es un complejo que se recluta en las membranas del TGN/EE, orgánulo clave en el transporte a múltiples destinos (Day et al., 2018), es posible que medie el transporte de proteínas a otras localizaciones, y su localización alterada sea la causa de los fenotipos descritos anteriormente. En este sentido, un artículo reciente implica al complejo homólogo de *Schizosaccharomyces pombe* en la asistencia al transporte hacia diferentes compartimentos además de la MP (Hoya et al., 2017).

Análisis evolutivos de la distribución del exómero y sus diferentes subunidades han concluido que el complejo está presente a lo largo de todo el clado de los hongos (Roncero et al., 2016; Trautwein et al., 2006), aunque el número de ChAPs en cada especie varía desde los 4 presentes en *S. cerevisiae*, hasta solo 1 presente en *S. pombe*.

6. FISIOLÓGÍA DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA

Como ha sido descrito en apartados anteriores, muchas proteínas transmembrana van a llevar a cabo su función en la MP. Como proteínas integrales de membrana que son, para su correcto funcionamiento, localización, posible reciclaje y degradación, van a seguir las dinámicas de la ruta secretora y endocítica. Así, en la MP numerosas proteínas transmembrana van a mediar procesos tan importantes para la célula como la síntesis de los polímeros de la PC (para más información revisar apartado 3.2 de la introducción), el balance iónico o la toma de nutrientes. Los dos últimos procesos serán detallados a continuación.

6.1. Transporte de iones en la membrana plasmática

Junto a los principales elementos orgánicos, es decir, carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno y fósforo, un organismo requiere de otros elementos químicos adicionales para su crecimiento. En el medio acuoso, estos elementos existen como iones cargados, que junto a los protones e iones hidroxilo, permiten las reacciones celulares. Además, los iones en el entorno de las membranas forman parte del gradiente electroquímico que permite el transporte de otras sustancias como azúcares o aminoácidos y la síntesis de ATP. El potasio es indispensable para procesos biológicos como la regulación del pH y el volumen celular, el mantenimiento del potencial de membrana o la síntesis proteica. El sodio, en plantas, al igual que el potasio, participa en el mantenimiento de la turgencia celular, y en animales es necesario para el balance de electrolitos y los impulsos nerviosos. El cloruro también es importante en el balance de electrolitos, así como en el mantenimiento del potencial de membrana. Elementos traza como el cobre, hierro, manganeso, magnesio y zinc son vitales para la estructura de proteínas y como cofactores enzimáticos. El calcio, además de estas dos propiedades, también es imprescindible como molécula señalizadora. Por otro lado, no hay que olvidar que estos elementos también pueden llegar a ser tóxicos, por lo que la célula ha desarrollado mecanismos para adquirirlos, utilizarlos, guardarlos y en caso necesario, expulsarlos de la célula. Por si solos, los iones no son capaces de difundir a través de la bicapa lipídica, es por ello que necesitan de la ayuda de canales, transportadores o bombas, todos ellos constituidos por proteínas, muchas de ellas con múltiples dominios transmembrana (Cyert and Philpott, 2013).

Durante el desarrollo de esta tesis, una parte del estudio se ha centrado en analizar el tráfico intracelular de proteínas implicadas en la homeostasis de los metales alcalinos. Por esta razón la introducción se focaliza en el papel biológico de estos cationes monovalentes.

Sodio, potasio, litio, rubidio, cesio y francio, constituyen la familia de los metales alcalinos. Entre sí comparten estructura atómica y propiedades químicas, y además, en solución acuosa rápidamente constituyen cationes monovalentes. El K^+ es requerido para compensar el balance de cargas negativas en torno a las membranas y como cofactor en la síntesis del piruvato y en la traducción de proteínas. Sin embargo, el Na^+ es tóxico en altas concentraciones, ya que sustituye al

K⁺ en las reacciones biológicas. A pesar de que en el ambiente el Na⁺ es mucho más abundante que el K⁺, las levaduras han desarrollado mecanismos para mantener en la célula un alto ratio K⁺/Na⁺. Así, las células expulsan Na⁺ mientras que mantienen un flujo constante de entrada y salida de K⁺, proceso vital para el mantenimiento del potencial de la membrana y del pH citosólico. Además, las células también son capaces de almacenar Na⁺ en la vacuola, disminuyendo así su presencia en el citoplasma, así como ayudando a contrarrestar las cargas negativas de los polifosfatos almacenados en ella (Ariño et al., 2010).

En *S. cerevisiae* se han descrito más de 10 proteínas o complejos proteicos implicados en el transporte específico de metales alcalinos. La mayoría en la membrana plasmática (Trk1/2, Tok1, Pho89, Ena1-5, Nha1 y el putativo sistema NSC1), donde proveen a las células de potasio, eliminan cationes tóxicos comunes como el sodio y el litio, regulan el pH y el potencial de membrana, y ayudan a mantener la turgencia celular. Con funciones similares, existen transportadores que median procesos de simporte K⁺/Cl⁻ en la vacuola (Vhc1), o antiporte K⁺/H⁺ en vacuola (Vnx1), endosomas (Nhx1), aparato de Golgi (Kha1) y mitocondria (Mdm38 y Mrs7) (Figura 14).

La mayoría de estas proteínas intercambian metales alcalinos por protones, es decir, son transportadores secundarios que requieren de un transporte activo primario, el cual es llevado a cabo por las bombas de protones; P-ATPasas situadas en la membrana plasmática (Pma1/2) y en la membrana endosoma-vacuolar (complejo V-ATPasa). Por otro lado, existen canales (Tok1 y NSC1) y

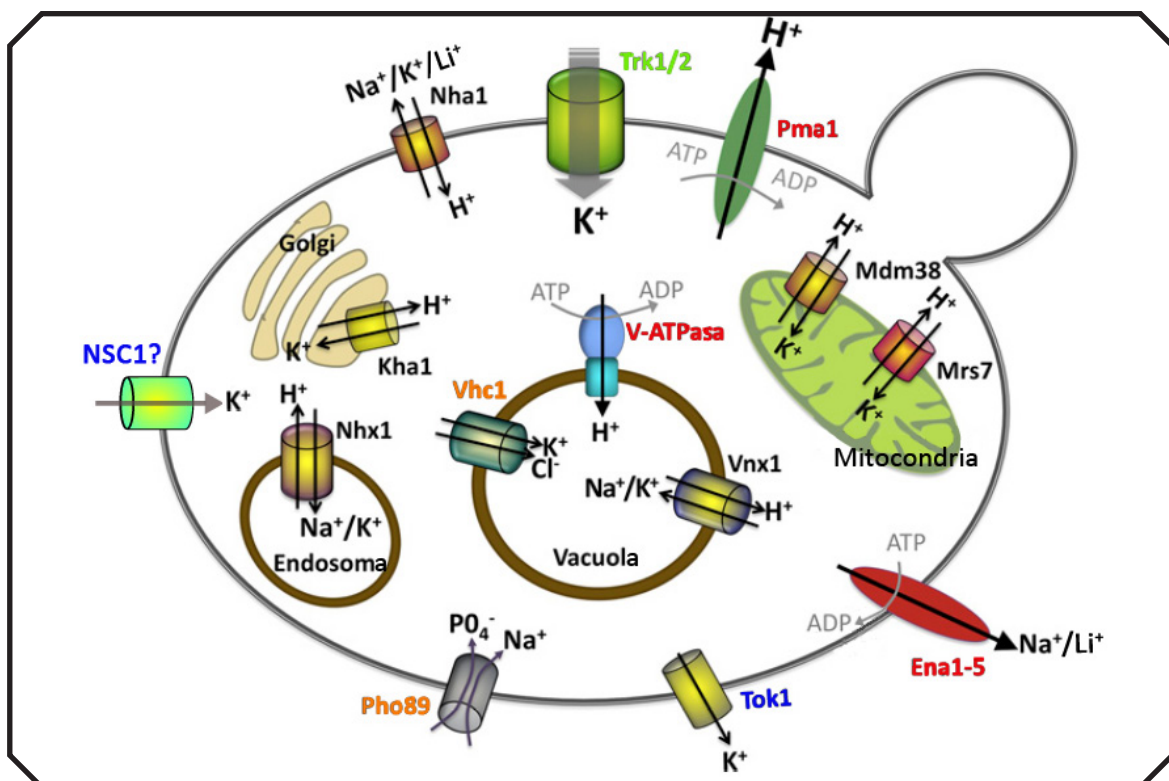


Figura 14. Canales, bombas y transportadores iónicos en *S. cerevisiae*. Representación de los principales complejos implicados en la permeabilidad selectiva de las membranas celulares a diferentes iones. Destacar la presencia de dos complejos ATPasa, uno en la membrana plasmática y otro en la membrana de la vacuola, que bombean protones para generar el gradiente electroquímico del que dependen los transportadores pasivos. Adaptado de Cyert and Philpott, 2013.

ATPasas (Ena1-5) que funcionan independientemente del gradiente electroquímico generado por el bombeo de protones (**Figura 14**).

La **entrada de potasio** en la célula, es llevada a cabo mayoritariamente por dos proteínas transmembrana (Trk1/2) con 12 dominios transmembrana, parálogas entre sí y que funcionan como un uni-portador de K^+ dependiente del gradiente electroquímico. La viabilidad de las cepas *trk1Δ* *trk2Δ*, sugiere la existencia de otro sistema minoritario que introduce potasio (NSC1). Además, se ha postulado que la proteína Qdr2, descubierta por conferir resistencia a quinidina y a otros compuestos tóxicos, pudiera mediar también la entrada de potasio. En cuanto a la **salida de potasio**, se han descrito tres transportadores capaces, aunque dos de ellos (Nha1 y Ena1-5) están especializados en la excreción de sodio. En cambio, Tok1 es una proteína con 8 dominios transmembrana que permiten la formación de 2 canales específicos para el potasio. Aunque su papel fisiológico está por descubrir, se sabe que su apertura o cierre es dependiente del potencial de membrana. Por otro lado, la **entrada de sodio** es minoritaria y normalmente está ligada a una baja especificidad de los canales de potasio (fruto de un exceso de sodio extracelular) o a un simporte que introduce sodio a la vez que ion fosfato (Pho89). Para la **expulsión de sodio y litio** existen dos mecanismos diferentes. Por un lado el grupo de genes *ENA*, que se encuentran formando un tándem en el cromosoma IV con hasta 5 ORFs (fases de lectura abierta) dependiendo de la cepa. Estos genes homólogos se expresan en respuesta a estrés salino o pH alcalino, y codifican para bombas tipo P-ATPasa que excretan sodio y litio gracias a la hidrólisis de ATP. Por otro lado, el anti-portador Nha1, expresado constitutivamente y con especial relevancia en medios con pH ácido (cuando no se expresa *ENA*), se encarga de expeler cationes Na^+ , Li^+ y en menor medida K^+ , usando a su favor la fuerza protón-motriz generada por Pma1/2. Por lo tanto, el adecuado funcionamiento de las proteínas Ena y Nha1 es esencial para el crecimiento en medios con alta concentración de cationes alcalinos. Revisado en Ariño et al., 2010; Cyert and Philpott, 2013 (**Figura 14**).

6.2. Respuesta al estrés catiónico y la ruta RIM101

Las levaduras, a lo largo de su ciclo vital se ven expuestas a múltiples situaciones de estrés, ante las que debe responder para conservar la viabilidad. Una situación común es la perturbación de la homeostasis catiónica. Frente a esta situación, la célula posee una intrincada red de señalización que le permite generar respuestas a diversos niveles con el fin de reestablecer el balance catiónico independientemente de las condiciones del medio. En esta línea, hay múltiples sensores que, una vez detectados los cambios, activarán diversas rutas que tendrán como objetivo la regulación de los efectores finales, que en este caso son los canales, bombas y transportadores. Así, existen varias rutas que modulan la expresión, localización, degradación y función de los sistemas transportadores descritos anteriormente. Para responder a los diferentes estímulos tiene que existir una respuesta coordinada por parte de todos los efectores, es por ello, que algunas rutas de señalización actúan sobre varias proteínas; tal es el caso de la ruta de respuesta a estrés osmótico HOG, que activa la función de Nha1 y Tok1 y la expresión de los genes *ENA1-5*. Aunque virtualmente en todos los efectores del balance catiónico hay un control post-traducciona, la expresión génica de la mayor parte de los sistemas de entrada y salida de cationes es constitutiva y sufre poca variación en situaciones de estrés. Sin embargo, la excepción es el gen *ENA1*, cuya expresión es extraordinariamente incrementada en presencia de iones tóxicos como el Na^+ o el Li^+ , o en situaciones de alcalinización del medio. Existen múltiples señales y rutas que, constituyendo una intrincada red, controlan la

expresión del gen *ENA1*. Entre ellas cabe destacar la ruta de osmoregulación HOG, la ruta de la calcineurina, la ruta RIM101, el control nutricional por Snf1 y TORC1 o la ruta PKA. Revisado en Ariño et al., 2010.

Si nos centramos en el estrés salino y el provocado por alcalinización del medio, están descritas varias rutas de señalización que median una respuesta celular coordinada. Por un lado está la **ruta de la calcineurina**. La despolarización del potencial de membrana provocada por el exceso de cationes salinos dentro de la célula o por la alcalinización del medio, activará la toma de calcio por los canales Mid1 y Cch1. El rápido incremento de calcio activará un complejo heterotrimérico con actividad Ser/Thr fosfatasa denominado calcineurina, el cual desfosforilará el factor de transcripción Crz1 que migrará al núcleo donde inducirá la expresión de múltiples genes de respuesta a estrés catiónico, donde podemos destacar *ENA1*. Por otro lado, existen varios represores de los genes de respuesta que, en presencia del estrés, serán inhibidos o degradados. Tal es el caso de la **ruta PKA**, importante en la función nutricional, que en condiciones normales inhibe al activador transcripcional Crz1, y que en situaciones de estrés alcalino se ve inhabilitada. O la proteína **Ppz1**, un inhibidor de la calcineurina, que en situación de estrés es reprimida por Hal3. También es el caso de los represores transcripcionales de alto espectro **Nrg1** y **Smp1**, que ante diversos estreses verán inhibida su propia expresión; ya sea a través de la **ruta de Snf1**, inicialmente descrita en control nutricional, o a través de la **ruta RIM101**, vía específica de respuesta a pH alcalino que será detallada más adelante. Por si no fuera suficiente, existen otras rutas con funciones diferentes, pero que participan en cierta medida en la respuesta a sales y pH alcalino, como es el caso de **Sit4**, un inhibidor dependiente de TORC1; la **ruta HOG** de respuesta a estrés osmótico, ya que las sales en alta concentración pueden generar dicho estrés; y la **ruta CWI** de integridad de la pared celular, porque el cambio brusco a pH alcalino puede generar un daño mecánico en la pared celular. Revisado en Ariño et al., 2010; Serra-Cardona et al., 2015.

De especial relevancia para el desarrollo de esta tesis, centrada en el transporte intracelular de proteínas, ha sido el estudio de la **ruta RIM101**, una ruta que media, entre otras cosas, la respuesta a pH alcalino a través de un procesamiento proteolítico del represor Rim101. Rim101 es un represor transcripcional de tipo C_2H_2 -dedo de zinc que media una respuesta adaptativa ante cualquier situación que altere el potencial de membrana, ya sea por una alcalinización del medio, la presencia de ionóforos o la alteración en la asimetría lipídica de la MP (Obara and Kihara, 2014). La ruta de señalización está compuesta por un complejo sensor dispuesto en puntos discretos a lo largo de la MP y un complejo proteolítico que será reclutado a las inmediaciones y llevará a cabo el procesamiento del extremo C-t de Rim101 (**Figura 15**). Así, el sistema sensor está compuesto por tres proteínas transmembrana (Rim21, Dfg16 y Rim9) y una proteína citosólica de tipo α -arrestina (Rim8); mientras que el bloque proteolítico lo componen distintas subunidades del complejo endosomal ESCRT I-III, la proteína con dominio tipo BRO1 Rim20, encargada de dirigir el procesamiento, y la proteasa Rim13 (**Figura 15**). La hipótesis actual habla de una activación de Rim21/Dfg16 que permitirá el reclutamiento de Rim8, que permanecerá unida a la MP durante los primeros instantes de la despolarización. Se ha postulado que Rim8 mediará la acumulación en esta región cortical del complejo ESCRT I, este a su vez al ESCRT II y, por último, a Snf7 y al resto de subunidades del ESCRT III, todo ello por un proceso de ubiquitinación dependiente de la ubiquitin-ligasa Rps5. Se cree que Rim8 tendría un papel similar al ESCRT 0 en la maduración del compartimento endosomal del cuerpo multi-vesicular. Sobre esta estructura de complejos ESCRT III, unida a la MP o a una región

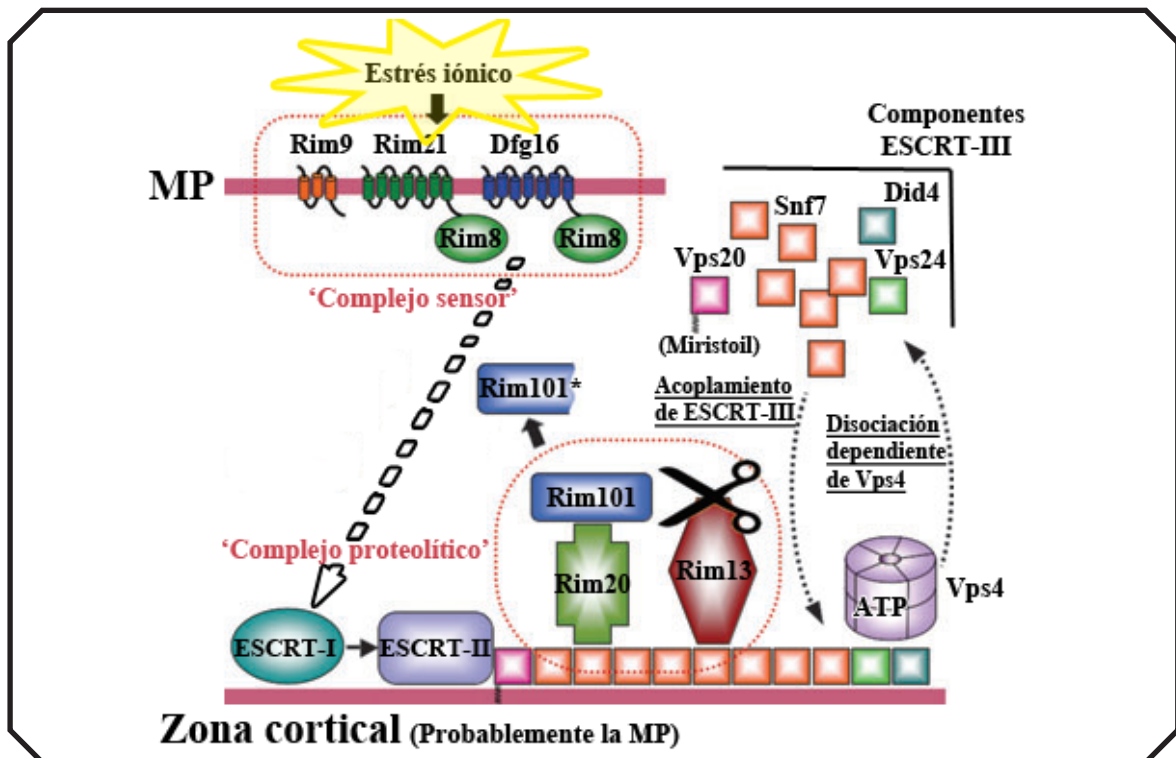


Figura 15. Ruta RIM101: recepción, transducción y procesamiento proteolítico. Ante una alcalinización del medio, en la membrana plasmática se activa un sensor multiproteico. A su vez, el sensor activa Rim8, y este es el encargado de la transducción hacia el complejo proteolítico, que se reclutará en las inmediaciones. Este complejo mediará el procesamiento proteolítico del extremo C-terminal del factor transcripcional Rim101, que tras ser procesado modulará la expresión génica. Una vez activada la ruta, se liberarán los componentes del complejo proteolítico desde la zona cortical al citoplasma, proceso dependiente de Vps4, subunidad de la ATPasa vacuolar. Adaptado de Maeda, 2012.

adyacente, se reclutará a la proteína Rim20, que dirigirá el procesamiento del extremo C-terminal de Rim101 por la proteasa Rim13. Una vez procesado, Rim101 migrará al núcleo donde actuará como represor de varios genes, entre los que cabe destacar Nrg1 y Smp1, que son a su vez represores de la transcripción de genes de respuesta a alteraciones en el balance catiónico. De este modo, la activación de la ruta permitirá expresar proteínas reguladoras, así como proteínas transportadoras como son la bomba de Ena1 y el canal de baja especificidad Qdr2. Revisado en Maeda, 2012; Obara and Kihara, 2014; Peñalva et al., 2014; Serra-Cardona et al., 2015.

6.3. La membrana plasmática y el metabolismo de aminoácidos

Como se mencionó anteriormente, el gradiente electroquímico que se genera por acción de las ATPasas de protones, a nivel de la MP y la membrana vacuolar, será el responsable del flujo de nutrientes hacia el interior celular y entre los diferentes compartimentos. Así, los diferentes transportadores o permeasas se valdrán de este gradiente para transportar diversos nutrientes a través de las membranas: glúcidos, aminoácidos, péptidos, grupos fosfato, bases nitrogenados, etc.

Centrándonos en el metabolismo del nitrógeno, hay que mencionar, que el catabolismo del nitrógeno, el anabolismo de aminoácidos (aa') y las rutas de síntesis de nucleótidos, funcionan en paralelo y de forma coordinada. Para conseguir esa coordinación, la célula debe controlar

las concentraciones de nutrientes dentro y fuera del espacio celular. En esta línea, en la MP hay múltiples sensores que monitorizan los niveles de los diversos compuestos. Además, las rutas catabólicas y anabólicas generan metabolitos secundarios que muchas veces constituyen señales para esta intrincada red de señalización. En respuesta a estas señales, al igual que se describió para los sistemas de transporte de iones, las levaduras modifican sus efectores metabólicos a nivel transcripcional, traduccional y post-traduccional. Además de ser capaces de sintetizar todos los aa' proteinógenos, las levaduras son capaces de usar gran variedad de elementos como fuente de N, entre los que cabe destacar, además del amonio, todos los L-aminoácidos con excepción de lisina, histidina y cisteína. Sin embargo, existen fuentes preferentes que permiten un crecimiento más acelerado (amonio, Asn, Gln, Glu o Asp) y fuentes menos preferidas, cuya metabolización es más costosa dilatando así el tiempo de generación celular (Leu, Ile, Met o Trp).

Una vez han entrado en la célula a través de la gran variedad de permeasas (**Figura 16**), los aa' pueden ser usados directamente para la síntesis de proteínas, pueden ser desaminados para producir amonio o pasar a ser sustrato de las transaminasas para transferir sus grupos aminos a otros aa'. Las fuentes preferentes, además de permitir un rápido crecimiento, provocan la represión de genes encargados de metabolizar las fuentes no preferentes. Este fenómeno de regulación se conoce como represión catabólica por nitrógeno (en inglés **NCR**) que, en presencia de una fuente preferente de N, reprime la expresión de múltiples genes, entre los que hay varias permeasas de aa' (*GAP1* o *CAN1*) (**Figura 16**). Otra ruta importante en el metabolismo del nitrógeno es la mediada por el complejo **TOR**. Inicialmente se pensaba que la ruta de TORC1 afectaba directamente a la NCR controlando la retención citosólica del factor Ure2. Sin embargo, muchas pruebas apuntan a que este efecto es indirecto, y la ruta de TORC1 controla el metabolismo del nitrógeno de una forma paralela al NCR, fundamentalmente controlando el tráfico endosomal de las permeasas. Así, el complejo TORC1 es un inhibidor del regulador de permeasas Nrp1 y la fosfatasa general PP2A. En condiciones de estrés nutricional se inactiva TORC1, permitiendo la activación de Nrp1 y PP2A, que entre otras cosas va a permitir la síntesis y activación de permeasas de aa' (Boeckstaens et al., 2014; González and Hall, 2017; Merhi and Andre, 2012). Además, existe una regulación global de la expresión de enzimas biosintéticas y permeasas denominada control general por aa' (en inglés **GAAC**) que, a través de la activación de la traducción del factor de transcripción Gcn4, permite la expresión de los genes encargados de obtener, por síntesis o por captación, los aa' que requiera la célula. Por último, cabe destacar el sistema **SPS**. Esta ruta de señalización, que recibe el nombre por las proteínas que conforman el sensor (Ssy1, Ptr3 y Ssy5), se encarga de regular la expresión de varias permeasas específicas cuando el/los aminoácido/s a internalizar son detectados en las inmediaciones de la membrana plasmática. De forma resumida, Ssy1 es un canal-sensor con varios dominios transmembrana que, habiendo perdido su capacidad de transportar aa', es capaz de detectar los niveles de aa' y enviar una señal. Situado en los sitios de contacto entre MP y retículo endoplásmico (Kralt et al., 2015), es donde se activa detectando los niveles de aa', lo cual conlleva a un procesamiento proteolítico de los factores de transcripción Stp1/Stp2 que migrarán al núcleo donde modulan la expresión de los genes codificantes de permeasas. La inducción de permeasas mediada por la ruta SPS es independiente de la ruta NCR, al contrario que la regulación de otras permeasas como la permeasa general de aa' Gap1.

Aunque se agrupan en varias familias, las permeasas de aa' son proteínas transmembrana que presentan una estructura muy conservada. La mayor parte de ellas pertenecen a la superfamilia

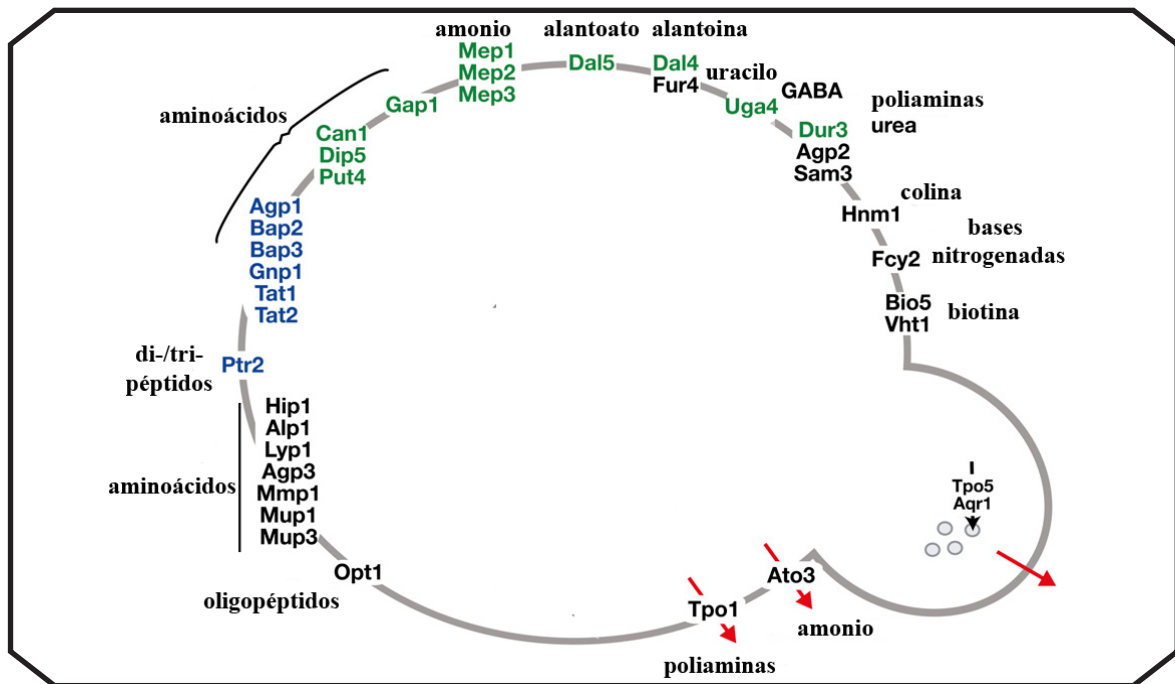
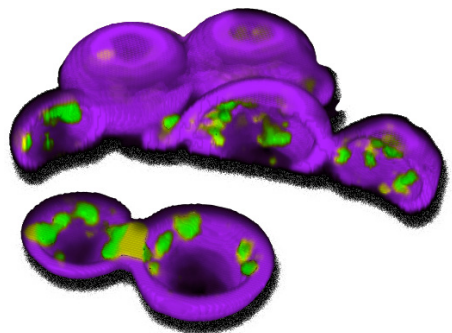


Figura 16. Sistemas de transporte de compuestos nitrogenados en *S. cerevisiae*. Se muestran los transportadores de aminoácidos de la membrana plasmática junto a su sustrato. En verde se muestran los transportadores cuya expresión es dependiente de la NCR y en azul los que dependen del sensor de aminoácidos externos SPS. Los transportadores que participan en la excreción están indicados con una flecha roja, y se localizan en la membrana plasmática o en vesículas exocíticas. Adaptado de Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012.

de transportadores APC y presentan 12 dominios transmembrana que conforman un poro con diferente grado de especificidad para transportar aa' a través de la membrana. Estas proteínas, además de presentar una síntesis muy regulada, sufren varias modificaciones post-traduccionales que permiten la regulación de su transporte y degradación, destacando el papel de la ubiquitinación (Gournas et al., 2016).

Por lo tanto, las permeasas, controladas a múltiples niveles, van a permitir regular el flujo de entrada de los compuestos nitrogenados. Tanto las permeasas como muchos de los complejos reguladores están altamente conservados en el dominio eucariota. Sin embargo, cada organismo presenta un abanico diferente de posibilidades para adaptarse a los nutrientes presentes en el medio. Así, en *S. cerevisiae* las permeasas de aa' varían en especificidad, capacidad y regulación (**Figura 16**). Revisado en Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012.

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN



METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección de la memoria de tesis doctoral se desarrolla el trabajo experimental llevado a cabo, incluyendo la metodología empleada, los resultados y la discusión surgida del trabajo científico. Teniendo en cuenta las líneas de investigación llevadas a cabo durante esta tesis doctoral, se ha dividido el contenido en 3 capítulos. En los dos primeros se expondrá trabajo previamente publicado o en proceso de revisión, mientras que en el capítulo 3 se desarrollarán resultados no publicados, obtenidos a lo largo de esta tesis doctoral. Una discusión general, que engloba al conjunto de la investigación, se abordará en otra sección independiente de la memoria.

Los capítulos 1 y 2 constan de uno o dos artículos científicos que son el resultado de cada línea de investigación. Dichos artículos están precedidos de una breve introducción con los antecedentes y objetivos planteados al inicio de cada trabajo, y de un resumen en castellano de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO 1: Implicaciones del exómero en el metabolismo catiónico

Anton, C., Zanolari, B., Arcones, I., Wang, C., Mulet, J.M., Spang, A., and Roncero, C. (2017). Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol. Biol. Cell* 28, 3672–3685.

CAPÍTULO 2: El exómero en perspectiva evolutiva

Anton, C., Valdez Taubas, J., and Roncero, C. (2018). The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi. *Genetics* 208 (4), 1483–1498.

Ramirez-Macias, I., Barlow, L.D., Anton, C., Spang, A., Roncero, C., and Dacks, J.B. (----) Evolutionary cell biology traces the rise of exomer complex function in Fungi from an ancient eukaryotic component. En revisión.

CAPÍTULO 3: El exómero en el metabolismo del nitrógeno

(Resultados no publicados)

CAPÍTULO 1:

Implicaciones del exómero en el metabolismo catiónico

Anton, C., Zanolari, B., Arcones, I., Wang, C., Mulet, J.M., Spang, A., and Roncero, C. (2017). Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol. Biol. Cell* 28, 3672–3685.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El complejo del exómero media el transporte de un escaso número de proteínas desde el compartimento red *trans*-Golgi (TGN)/endosomas tempranos (EE) hasta la membrana plasmática (MP). Así, en ausencia del exómero o algunas de sus subunidades, las proteínas Chs3, Fus1 y Pin2 quedan bloqueadas en dicho compartimento. La retención de Chs3 provoca la ausencia de síntesis del anillo de quitina (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006), mientras que el bloqueo de Fus1 reduce la eficiencia de fusión celular en el proceso de conjugación (Barfield et al., 2009). Sin embargo, el bloqueo de Pin2 provocado por la ausencia del exómero no ha podido ser ligado a ningún fenotipo. Por otro lado, también se ha descrito una hipersensibilidad de los mutantes del exómero a varios compuestos, todos ellos de naturaleza catiónica: higromicina B, litio, sodio y amonio (Fell et al., 2011; Ritz et al., 2014; Trautwein et al., 2006). Sin embargo, ninguno de estos fenotipos había sido relacionado con un fallo en el transporte de alguna proteína implicada en homeostasis catiónica.

Para entender el origen molecular de esta hipersensibilidad mostrada por los mutantes del exómero a estos cationes tóxicos, hay que entender las herramientas moleculares que presenta *S. cerevisiae* para lidiar con todos ellos y, la posible implicación del exómero en lo que se conoce como homeostasis del balance catiónico. Estas sustancias ejercen su actividad tóxica al entrar dentro de la célula, para lo cual tienen que atravesar las membranas celulares, que son prácticamente impermeables a estas moléculas fuertemente cargadas. Sin embargo, estos elementos son capaces de entrar a través de canales embebidos en la MP, que, aunque específicos para el transporte de iones vitales como el potasio, permiten el traspaso parcial de estos cationes tóxicos. Así, la levadura se defiende de su toxicidad reduciendo su entrada o incrementando su excreción mediante la regulación de varios transportadores, la mayoría localizados en la MP. La toma de cationes de metales alcalinos depende fundamentalmente de los uni-transportadores dependientes de gradiente Trk1/2, específicos para potasio. En cambio, para la salida participan varios transportadores: el canal dependiente de potencial de membrana y específico para potasio Tok1, el anti-transportador protón-catión Nha1 y las bombas ATPasa Ena1-4 codificadas por un tándem de genes; siendo los dos últimos canales específicos para la extrusión de cationes tóxicos como Na⁺ y Li⁺ (Ariño et al., 2010). Por otro lado, varias proteínas codificadas por genes que recibieron el nombre de *HAL*, por su papel en halo-tolerancia, se han descrito como reguladores de la función de estos canales. Entre ellos, cabe destacar los reguladores positivos Hal1, Hal3, Hal4 y Hal5 (Mulet et al., 1999; de Nadal et al., 1998; Rios et al., 1997), y el regulador negativo Hal2 (Murguía et al., 1996). También, la fosfatasa Ppz1/2, importante en esta halo-tolerancia, regula negativamente la función de los canales Trk1/2 (Yenush et al., 2002). Además, como se vio en la introducción, varias rutas de transducción de señales modularán la función de estos canales a múltiples niveles, tal es el caso de la ruta de la calcineurina y la ruta RIM101 (Ariño et al., 2010).

Partiendo de estas premisas, en un esfuerzo conjunto con los laboratorios de los Profesores Anne Spang y José Miguel Mulet, decidimos analizar las causas moleculares inherentes a los fenotipos de hipersensibilidad a los cationes que presentan los mutantes del exómero.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El exómero es necesario para el mantenimiento de la homeostasis catiónica

Un análisis comparativo de sensibilidad a diferentes cationes entre el mutante del exómero *chs5Δ* y las deleciones de los genes codificantes de los canales *Trk1/2* y *Ena1-4* reveló que, el mutante del exómero compartía perfil de sensibilidad con el mutante carente de canales *Ena*. La sensibilidad de estas dos cepas a estos cationes era similar a excepción del amonio, para el que *chs5Δ* era mucho más sensible que *ena1-4Δ*. Un bloqueo en el transporte de estos canales en el mutante del exómero podría explicar la hipersensibilidad a los cationes tóxicos.

Por otro lado, una búsqueda de genes supresores del fenotipo de sensibilidad a litio del mutante *chs5Δ* reveló una batería de genes cuya sobreexpresión revertía dicha sensibilidad en el mutante. Así, al sobreexpresar los genes *HAL1*, 3, 4 y 5, la hipersensibilidad a sodio y litio del mutante era revertida. Estos genes son elementos claves en la tolerancia a sales, y ejercen su función regulando la función de *Trk1/2* y *Ena1-4*. Por lo tanto, estos resultados apuntaban a una alteración en la función de los canales encargados de mantener la homeostasis catiónica.

Finalmente, el análisis de la toma del ión Rb^+ (medida indirecta de la toma de K^+) y de los niveles totales de K^+ , reveló un fallo general en la homeostasis de la función catiónica en el mutante del exómero.

Ena1 depende del exómero para su correcta expresión y polarización celular

Basándonos en los resultados anteriores, decidimos analizar el efecto directo de la sobreexpresión de los canales implicados en la homeostasis catiónica. Así, tras analizar la sobreexpresión de varios canales, solo el incremento de *Ena1* y *Qdr2* era capaz de revertir la sensibilidad a litio y sodio del mutante *chs5Δ*, mientras que la sobreexpresión de *Qdr2* fue la única capaz de revertir la sensibilidad al amonio. Sin embargo, teniendo en cuenta su baja especificidad en la extrusión de cationes, y que el mutante *qdr2Δ* no es sensible al Na^+ ni al Li^+ (Ríos et al., 2013), este canal no parecía ser la respuesta a la sensibilidad del mutante del exómero a metales alcalinos.

Centrándonos en la etiología de la sensibilidad a Na^+ y Li^+ , analizamos en profundidad el canal *Ena1*. El análisis por microscopía y 'western blot' reveló una función alterada de *Ena1*. Así, en el mutante hay menos cantidad de *Ena1* y la que hay se polariza deficientemente ante diferentes estímulos tóxicos. A diferencia del mutante, en la cepa silvestre *Ena1* en situaciones de estrés catiónico se polariza bruscamente hacia la MP de la yema. Es posible que esta polarización tenga una función biológica ya que esta zona está en continua remodelación y, es donde hay mayor síntesis de estructuras, haciéndola más susceptible a diferentes estreses. Así, el exómero contribuiría a concentrar rápidamente en dicha zona a *Ena1*, con el fin de reducir la concentración del compuesto tóxico.

Nuevas funciones del exómero en el TGN/EE: ensamblaje del sensor de la ruta RIM101

Tanto por microscopía como por 'western blot' observamos variaciones en los niveles de los canales *Ena1* y *Qdr2* en el mutante del exómero con respecto al control, un perfil que se asemejaba a lo descrito para el mutante *rim101Δ* (Lamb and Mitchell, 2003). *Rim101* es un represor transcripcional que requiere un procesamiento proteolítico que es mediado por una cascada de transducción que se activa por un cambio en el potencial de membrana (Obara and Kihara, 2014).

A pH neutro-alkalino, Rim101 se procesa en la cepa silvestre, sin embargo, esto no ocurre en el mutante del exómero. En consonancia, los mutantes de la ruta comparten muchos fenotipos de sensibilidad a estrés catiónico o pH alcalino con *chs5Δ*. Además, la sobreexpresión de una versión procesada de Rim101 mejoraba parcialmente los fenotipos de sensibilidad a Li^+ y Na^+ del mutante del exómero. Finalmente, el análisis de la localización de los distintos elementos de la ruta de transducción determinó que el sensor, formado por las proteínas transmembrana Rim21, Dfg16 y Rim9, no se ensamblaba correctamente en puntos corticales discretos como ocurre en la cepa silvestre (datos de Dfg16 y Rim9 en **Figura C1.1**).

A diferencia de otras proteínas transportadas por el exómero, este complejo sensor no está polarizado. Además, la alteración de la localización que presenta el sensor en el mutante *chs5Δ* no se corrige cuando se elimina también el complejo AP-1 (*chs5Δ aps1Δ*). Por lo tanto, el sensor de la ruta RIM101 no encajaría en el grupo de cargos clásicos transportados por el exómero. Por el contrario, este fenotipo apuntaría a una posible función más general del exómero en el mantenimiento del TGN/EE, ya que es donde se quedan retenidos estos y otros cargos del exómero. Lo cual iría en consonancia a lo descrito en *Schizosaccharomyces pombe*, donde el exómero ejercería una función general junto a AP-1 (Hoya et al., 2017).

Los datos moleculares de Ena1 y la ruta RIM101 evidenciarían un nuevo marco de actuación del exómero en *S. cerevisiae*. Así, se constata que el exómero no solo tiene funciones en el transporte polarizado de ciertas proteínas, sino que también participa en la localización y función de proteínas que de algún modo están conectadas con el compartimento TGN/EE. Estas alteraciones en el compartimento TGN/EE provocarían una pérdida de la correcta función de Ena1, lo cual explicaría la hipersensibilidad a cationes alcalinos de los mutantes del exómero por su incapacidad de excretarlos al medio extracelular.

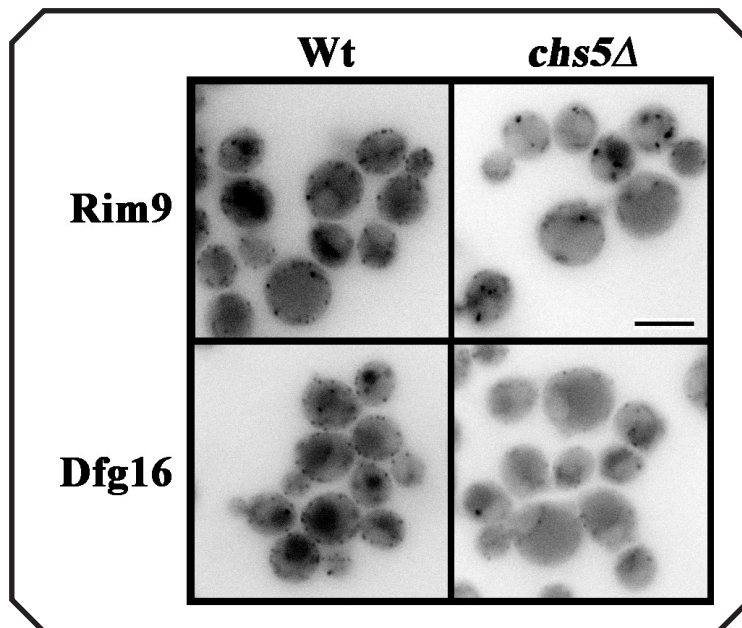


Figura C1.1. Localización de Rim9 y Dfg16. Distribución de Rim9-GFP y Dfg16-GFP en un medio SDc (copia endógena marcada con GFP en su extremo C-terminal). Barra de escala representa 5 μm .

Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations

Carlos Anton^a, Bettina Zanolari^b, Irene Arcones^a, Congwei Wang^b, Jose Miguel Mulet^c, Anne Spang^{b,*}, and Cesar Roncero^{a,*}

^aInstituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) and Departamento de Microbiología y Genética, CSIC-Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain; ^bBiozentrum, Growth & Development, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland; ^cInstituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, CSIC-Universidad Politécnica de Valencia, 46011 Valencia, Spain

ABSTRACT Exomer is an adaptor complex required for the direct transport of a selected number of cargoes from the *trans*-Golgi network (TGN) to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. However, exomer mutants are highly sensitive to increased concentrations of alkali metal cations, a situation that remains unexplained by the lack of transport of any known cargoes. Here we identify several *HAL* genes that act as multicopy suppressors of this sensitivity and are connected to the reduced function of the sodium ATPase Ena1. Furthermore, we find that Ena1 is dependent on exomer function. Even though Ena1 can reach the plasma membrane independently of exomer, polarized delivery of Ena1 to the bud requires functional exomer. Moreover, exomer is required for full induction of Ena1 expression after cationic stress by facilitating the plasma membrane recruitment of the molecular machinery involved in Rim101 processing and activation of the RIM101 pathway in response to stress. Both the defective localization and the reduced levels of Ena1 contribute to the sensitivity of exomer mutants to alkali metal cations. Our work thus expands the spectrum of exomer-dependent proteins and provides a link to a more general role of exomer in TGN organization.

Monitoring Editor
Akihiko Nakano
RIKEN

Received: Sep 12, 2017
Revised: Oct 4, 2017
Accepted: Oct 6, 2017

INTRODUCTION

Transmembrane proteins are regularly sorted into membrane vesicles for their traffic through the secretory and endocytic pathways by the action of dedicated cargo adaptors (Schekman and Orci, 1996; Bonifacino and Glick, 2004; De Matteis and Luini, 2008). These adaptors not only direct cargo loading but perform additional functions in vesicle biogenesis, including recruitment and the stabi-

lization of other coat components (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Spang, 2008).

Very limited mechanistic data are available concerning cargo sorting at the *trans*-Golgi network (TGN), one of the most prominent sorting stations in eukaryotic cells, in which cargo is packaged into vesicles destined for the plasma membrane (PM) (Bard and Malhotra, 2006; Bonifacino, 2014). In *Saccharomyces cerevisiae*, such secretory vesicles are the main source of lipids and proteins used to generate the PM of a daughter cell (Drubin and Nelson, 1996). However, the mechanisms involved in the biogenesis of these secretory vesicles, as well as the mechanisms for cargo sorting, have long remained elusive. The analysis of the exomer complex provided some mechanistic understanding of TGN sorting in *S. cerevisiae* (Trautwein *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Exomer serves as a kind of sorting platform at the TGN for the delivery of Chs3 and Fus1 to the PM (Barfield *et al.*, 2009; Trautwein *et al.*, 2006). Both proteins display a characteristic polarized distribution.

This article was published online ahead of print in MBoC in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E17-09-0549>) on October 11, 2017.

*Address correspondence to: Cesar Roncero (crm@usal.es) or Anne Spang (anne.spang@unibas.ch).

Abbreviations used: ER, endoplasmic reticulum; PM, plasma membrane; TGN, *trans*-Golgi network; TM, transmembrane.

© 2017 Anton *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

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

Moreover, exomer is well conserved across fungi (Trautwein *et al.*, 2006; Roncero *et al.*, 2016), raising some expectations as to whether exomer could act as a general platform for the sorting of polarized proteins at the TGN in fungi. Unfortunately, such expectations have not been fulfilled as the extensive efforts by several groups have only shown a very limited number of proteins to depend on exomer for PM localization. These include Chs3 (Santos and Snyder, 1997; Trautwein *et al.*, 2006), Fus1 (Barfield *et al.*, 2009), and the more recently described Pin2 (Ritz *et al.*, 2014), all of which are transmembrane (TM) proteins with polarized distribution. In contrast, we have advanced significantly in the understanding of the mechanistic aspects of the exomer complex itself. This complex is assembled at the TGN as a heterotetramer, consisting of two copies of the scaffold protein Chs5 and any two members of four paralogous proteins known as ChAPs (Chs5 and Arf1 binding proteins: Chs6, Bud7, Bch1, and Bch2) (Paczkowski *et al.*, 2012; Paczkowski and Fromme, 2014; Huranova *et al.*, 2016). The ChAPs and Chs5 bind to the Arf1 GTPase and help to remodel membranes, a process that is required for vesicle formation *in vitro* (Paczkowski and Fromme, 2014). Interestingly, not all ChAPs are equally effective in assembling the exomer complex. Bch1 and Bud7 have been proposed to be the most effective in triggering membrane remodeling because of a characteristic hydrophobic element in their sequences that is not present in Chs6 and Bch2 (Paczkowski and Fromme, 2014). Accordingly, Bch1 and Bud7 have been independently shown to be more efficient in the stabilization of exomer complexes (Huranova *et al.*, 2016).

Furthermore, ChAPs subunits have been proposed to determine cargo specificity by their direct interaction with the cytosolic tails of cargo proteins, a process in which Chs6 and Bch2 are the most effective (Huranova *et al.*, 2016). However, the direct interaction between the ChAPs and cargo has only been well documented for Chs6, which has been shown to interact with two different domains of its distinct cargo, Chs3. Deletion of specific N- and C-terminal cytosolic regions of Chs3 abolished exomer recognition and blocked Chs3 transport from the TGN (Rockenbauch *et al.*, 2012; Weiskoff and Fromme, 2014). Also, the *chs6Δ* mutant shares with *chs5Δ* all the phenotypes linked to the reduced levels of chitin brought about by Chs3 TGN sequestration (reviewed in Roncero [2002]) but none of the other exomer-related phenotypes.

As pointed out above, the number of exomer cargoes is small, and the known cargoes are rather different in terms of primary sequence, number of transmembrane domains (ranging from 1 to 8, based on bioinformatics analysis), and topology (type I and II TM proteins), making it difficult to understand the biological functions of exomer. However, all of the cargoes are localized in a polarized manner and are completely retained at the TGN in the absence of exomer. Interestingly, their transit to the PM is always restored in the absence of the AP-1 complex (Valdivia *et al.*, 2002; Barfield *et al.*, 2009; Ritz *et al.*, 2014), suggesting that it is their interaction with the AP-1 complex that makes them dependent on exomer for their arrival to the PM. This in fact has been shown in detail for Chs3, in which a specific N-terminal cytosolic region is required for its interaction with AP-1 (Starr *et al.*, 2012). In the absence of this domain, Chs3 still reaches the PM even in the absence of exomer (Starr *et al.*, 2012; Sacristan *et al.*, 2013). Similar data have been reported for Pin2 (Ritz *et al.*, 2014).

An intriguing unresolved issue regarding exomer function is the fact that exomer deficient mutants are highly sensitive to lithium, sodium, ammonium, or hygromycin (Trautwein *et al.*, 2006; Fell *et al.*, 2011; Ritz *et al.*, 2014). These phenotypes cannot be explained by defective transport of any of the previously described

exomer cargoes, including Pin2, which is rapidly endocytosed under hyperosmotic condition but whose deletion displays no increased Li⁺ sensitivity (Ritz *et al.*, 2014). All of the above substances are cationic molecules whose intracellular toxicity is prevented by either reducing their uptake or increasing their efflux through the regulation of several PM transporters. Alkali-metal cation uptake depends mostly on the activity of Trk1/2 potassium uniporters, while efflux relies on the activity of the potassium channel Tok1, the cation-proton antiporter Nha1, and the cation ATPase Ena1 (review in Ariño *et al.*, 2010). The regulation of such transporters is complex, and positive and negative regulators have been described. Several HAL (for halotolerance) gene products have been shown to act as positive regulators of these transporters, including Hal1 (Rios *et al.*, 1997), Hal3 (de Nadal *et al.*, 1998), and the Ser/Thr kinases Hal4 and Hal5 (Mulet *et al.*, 1999). In contrast, Hal2 is involved in halotolerance as a direct target of sodium toxicity (Murguía *et al.*, 1996). The activity of the protein phosphatases Ppz1/2 negatively regulates the potassium uptake mediated by Trk1/2, thus being negative regulators of halotolerance (Yenush *et al.*, 2002). Moreover, in the regulation of such transporters several signal transduction pathways also converge, including the calcineurin- and RIM101-dependent responses (Ariño *et al.*, 2010).

In this paper, we systematically addressed the hypersensitivity of the exomer mutant *chs5Δ* to cationic molecules by characterizing its phenotypes in detail and by identifying multicopy suppressors of cation sensitivity. Our results link the cation sensitivity observed in exomer mutants to defects in Ena1 ATPase function. Exomer appears to be involved in Ena1 function through two separate mechanisms: first, by controlling Ena1 expression through the RIM101 pathway and, second, by facilitating polarized Ena1 localization in the bud. Our results thus identify Ena1 as a novel exomer cargo and uncover new roles for the exomer complex.

RESULTS

Exomer mutants exhibit sensitivity toward cations and positively charged molecules

To understand the basis of the sensitivity of exomer mutants toward cationic molecules, we first compared the phenotypes of an exomer mutant to those with deletions in cationic transporters with similar hypersensitivities to cations (Figure 1), such as Trk1/2 and Ena1, major facilitators of K⁺ transport across the PM in yeast (Ariño *et al.*, 2010). We did not include Pma1 mutants because defects in the function of this ATPase have been linked to moderate resistance to cationic compounds (Perlin *et al.*, 1988). Therefore, a direct relationship between exomer and the function of Pma1 is unlikely. Trk1/2 have been reported to be the major K⁺ channel, while through genetic studies it became clear that the family Ena Na⁺ transporters is also involved in K⁺ homeostasis (Ariño *et al.*, 2010). Since Ena transporters are present in clusters, are highly conserved, and might have at least partially redundant functions, we used a mutant in which the cluster containing the four *ENA* genes was deleted (*ena1-4Δ*) (Yenush *et al.*, 2002). The quadruple *ena1-4Δ* and the double *trk1/2Δ* mutants were both sensitive to Li⁺ and Na⁺, but only the *ena1-4Δ* mutant was sensitive to hygromycin (Figure 1A); thus the *chs5Δ* phenotypes were more similar to those of the *ena1-4Δ* mutant. None of the ion transporter mutants showed resistance to calcofluor or sensitivity to NH₄⁺ (Figure 1A), the other classical phenotypes associated with exomer mutants (Trautwein *et al.*, 2006) or were sensitive to high osmolarity.

On the basis of the similarity of phenotypes, we next tested the localization of several major PM cation transporters in an exomer mutant to determine whether the transport of any of these proteins

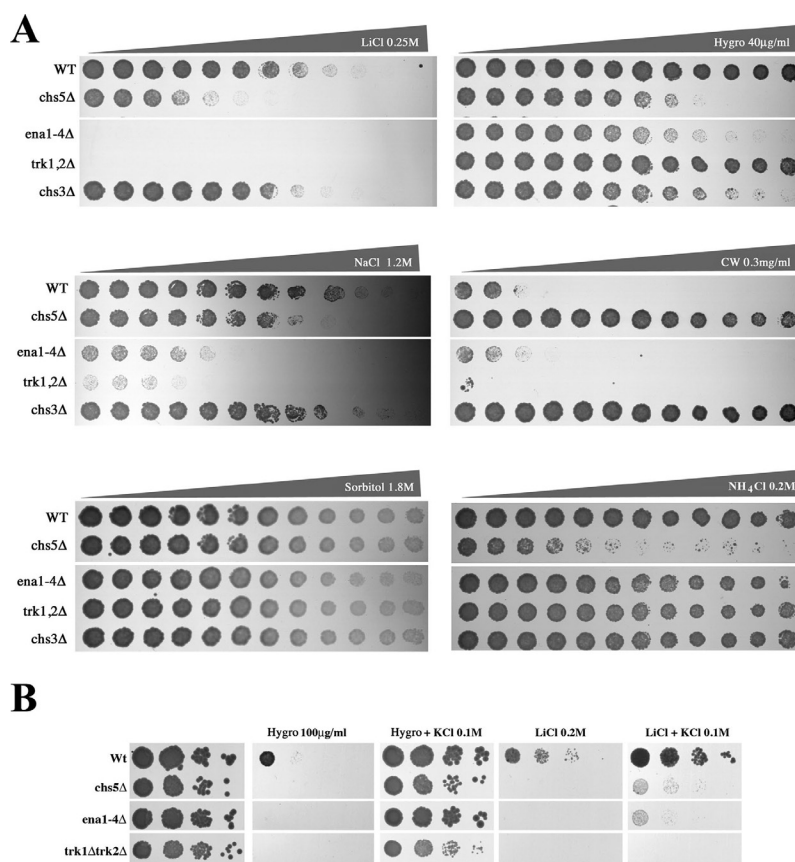


FIGURE 1: Comparative sensitivity between mutant strains deficient on exomer or different cation transporters. (A) Growth of different yeast strains on YEPD plates supplemented with increased concentrations of the indicated compounds. Gradient plates from 0 to the specified maximum concentration were made as described under *Materials and Methods*. (B) Sensitivity of the indicated strains to hygromycin or Li^+ in the absence or presence of 0.1 M KCl. Note the full suppression of hygromycin sensitivity on KCl-containing plates compared with the limited effect on Li^+ sensitivity.

was dependent on exomer. Trk1, Nha1, or Qdr2 localization was not affected in exomer mutants (Figure 2A). Ena1-GFP was barely detectable under normal growth conditions due to low expression levels, and therefore its localization was also assessed at pH 7.0 (Figure 2A, right panel). Again, Ena1-GFP efficiently reached the PM in both strains, and its localization appeared indistinguishable from that in wild type and the *chs5Δ* mutant. Therefore, our results did not indicate a direct link between Li^+/Na^+ sensitivity and defective localization of any of the major pumps involved in cation transport.

Finally, we determined Rb^+ uptake as an indirect measurement of K^+ transport and the cellular K^+ content. In exomer-deficient mutants, Rb^+ uptake was significantly impaired and comparable to the level of the *trk1/2Δ* K^+ transporter strain (Figure 2B). Interestingly, *chs5Δ* was more defective than the ChAPsΔ strain, indicating both a ChAPs-dependent and -independent function of Chs5 in this process. Likewise, a reduction of the intracellular K^+ content was observed in all mutants to the same extent as that observed in *trk1/2Δ* strains (Figure 2C). While the single ChAP deletion *bch1Δ* displayed a Rb^+ uptake activity similar to wild type, the K^+ levels were reduced, suggesting an increased K^+ efflux in this mutant. Interestingly, the

sensitivity of exomer mutants and the ion transporter mutants to hygromycin, but not to Li^+ , was abolished by high K^+ concentrations in the medium (Figure 1B), suggesting that the K^+ and Li^+ growth defects were not directly correlated. Taken together, our data so far indicate an involvement of exomer in cation homeostasis, which might be connected to the functionality of ion channels potentially through an altered function of cation extrusion.

Upregulation of halotolerance suppressed *chs5Δ* cationic sensitivity through upregulation of Ena1 ATPase

To gain a better understanding of the process, we searched for multicopy suppressors of the Li^+ sensitivity of the *chs5Δ* mutant by selecting colonies that were able to grow on plates containing 0.2 M Li^+ . After eliminating *CHS5*-containing plasmids, subcloning revealed both *HAL1* and *MTC1* as suppressors. The Maintenance of Telomere Capping gene (*MTC1*) is a poorly characterized gene whose overexpression was reported to be lethal (Sopko *et al.*, 2006), which explains why the *MTC1* overexpression rescue potential of *chs5Δ* on 0.2 M Li^+ was variable. Therefore, we focused our efforts on the other suppressor, *HAL1*. *HAL1* acted as a bona fide suppressor, since its overexpression restored growth of the *chs5Δ* mutant at 0.15 M Li^+ and 0.8 M Na^+ (Figure 3A) but not on high NH_4^+ . Hal1 provides halotolerance by decreasing cellular Na^+ via upregulation of Ena1 and by increasing K^+ through decreasing efflux (Rios *et al.*, 1997). Moreover, other *HAL* genes are involved in either transcriptional activation of *ENA1* or the regulation of Trk1/2 activity (Mulet *et al.*, 1999; Yenush *et al.*, 2002). Consequently, we asked whether overexpression of those *HAL* genes

could also rescue the *chs5Δ* cation sensitivity. Overexpression of *HAL3*, 4 and 5 also fully restored the growth of the *chs5Δ* mutant on high Li^+ and Na^+ plates, but only overexpression of *HAL3* significantly improved growth on NH_4^+ -supplemented media (Figure 3B). Hal3 is a negative regulator of the protein phosphatase Ppz1, which in turn is a negative regulator of Trk1/2 activity (Yenush *et al.*, 2002), while *HAL4* and *HAL5* encode for kinases acting as activators of Trk1/2 (Mulet *et al.*, 1999). Consistently, deletion of *PPZ1* improved growth of *chs5Δ* on Li^+ and Na^+ plates (Figure 3C). However, in contrast, overexpression of *HAL2*, a bisphosphate-3'-nucleotidase (Murguia *et al.*, 1996), had no effect on *chs5Δ* mutant phenotypes despite its expression levels being higher than that of *HAL5* (see Supplemental Figure S1). Taken together, our results indicate that overexpression of positive regulators of ion transporters improves the tolerance of *chs5Δ* toward high concentrations of cations, in particular alkali metals.

Given the results mentioned above, we hypothesized that downregulation of cationic transporters might be the cause for the Li^+ and Na^+ sensitivity of the exomer-deficient mutant *chs5Δ*. If our assumption was correct, then increasing the levels of cation-specific

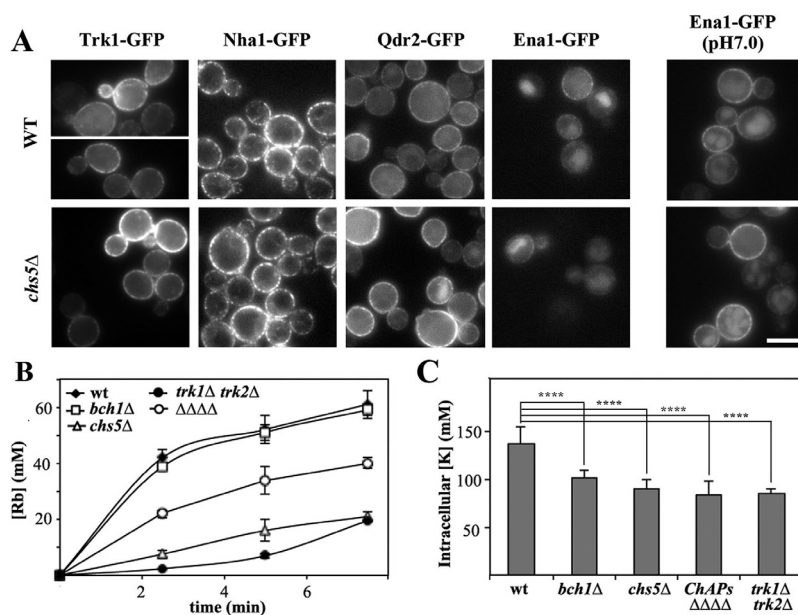


FIGURE 2: The localization of PM transporters in exomer mutants. (A) Localization of different PM transporters in wild-type and *chs5Δ* strains. Proteins were chromosomally appended with the GFP at their C-terminus, except Trk1-GFP, which was expressed from plasmid pRS414. All proteins were visualized in cells growing in nonbuffered SD media except Ena1-GFP, which was also visualized at pH 7.0. Note the similar localization in wild-type and *chs5Δ* strains. (B) Rubidium uptake in the different mutants and (C) intracellular levels of potassium. The strain labeled $\Delta\Delta\Delta\Delta$ corresponds to strain YAS563-16a in which all four ChAPs have been deleted (see Table 1).

permeases should equally increase ion tolerance of *chs5Δ*. Of the six candidates tested (*ENA1*, *TRK1*, *KHA1*, *NHX1*, *NHA1*, and *QDR2*) only overexpression of *ENA1* and *QDR2* improved growth of *chs5Δ* on Li^+ or Na^+ -supplemented plates (Figure 4A), and this effect cannot be explained by low expression levels of some of the genes as all genes were well overexpressed (Supplemental Figure S1). *Ena1* and *Qdr2* are both extrusion pumps. Therefore, the sensitivity of *chs5Δ* to cations is probably linked to a defect in extrusion of the toxic ions rather than to an influx defect. To test this notion, we measured Li^+ extrusion in both wild-type and *chs5Δ* strains (Figure 4B), resulting in a clearly reduced export of Li^+ in the *chs5Δ* mutant. In contrast to *ena1-4Δ*, *qdr2Δ* is neither Li^+ nor Na^+ sensitive (Ríos et al., 2013). Moreover, *Qdr2* was the sole transporter that was also able to rescue the NH_4^+ sensitivity of *chs5Δ*, reinforcing the idea that NH_4^+ and alkali metal sensitivity are genetically and physiologically separable. Thus, our analysis so far clearly points to low *Ena1* activity at the plasma membrane as the cause for *chs5Δ* sensitivity toward alkali metals. Therefore, we focused our further analysis on *Ena1*.

The absence of exomer alters *Ena1* expression and intracellular localization

First, we set out to solve a conundrum, since, as shown in Figure 2, we presented evidence that *Ena1* localization was independent of an exomer, even though all the genetic evidence contradicted this finding, unless an *Ena1*-activating cofactor was evoked as a cargo-dependent exomer. Thus, we reassessed *Ena1*-GFP localization after confirming that the *Ena1*-GFP construct was functional (Supplemental Figure S2A). *ENA1* expression is under strong transcriptional control (see (Ariño et al., 2010) for a review). Therefore, *Ena1*-GFP

was barely detected at acidic pH, such as in synthetic defined (SD) medium (Figure 5A); although some cells showed polarized distribution of the protein in the wild type (Figure 5A). Remarkably, *Ena1*-GFP levels seemed reduced in the *chs5Δ* mutant since fluorescence was barely detectable at the PM of the mutant. Raising the pH of the medium to pH 7.0 for 35 min significantly increased the fluorescence signal and, more importantly, still 50.6% of the wild-type cells showed polarized *Ena1* distribution. In contrast, *Ena1*-GFP levels in the *chs5Δ* mutant remained apparently lower, and the level of polarization was reduced (28.5%) compared with the wild type. Interestingly, maintaining pH 7 for 2 h led to almost complete loss of polarity of *Ena1*-GFP, and its localization became very similar in both strains. Challenging the cells with Na^+ reverted the equal *Ena1* plasma membrane distribution to a polarized localization in the bud. Even though this effect was observed in both strains, the repolarization was less efficient in *chs5Δ* compared with wild type. We sought an alternative way to analyze the polarization phenotype, which would also be independent of the *Ena1*-GFP expression levels in wild type and *chs5Δ*. We decided to determine the polarization coefficient given by the mean fluorescence intensity of the plasma membrane in the bud over the one in the mother cell (Figure 5B; see also Supplemental Figure S3A). Our data indicate that not only fewer cells show polarized *Ena1*-GFP localization in *chs5Δ* at pH 7 for 35 min and on addition of NaCl (Figure 5A) but also that the level of polarization is reduced when compared with wild type (Figure 5B). Therefore, exomer contributes to the polarized localization of *Ena1* under acute stress conditions.

The effect of the absence of exomer on *Ena1* expression was also confirmed by Western blot. Under noninducing conditions in SD media, *Ena1*-GFP was undetectable in both wild-type and *chs5Δ* strains (Figure 5C). Raising the pH to 7.0 (Figure 5C) or by directly adding NaCl to the media (see Figure S2C) triggered expression of *Ena1* in both wild-type and *chs5Δ* cells, although levels of the protein were always moderately lower in the *chs5Δ* mutant (Figure 5C and Supplemental Figure S2C). The effects of adding NaCl and alkalization were additive because NaCl treatment after alkalization of the medium augmented *Ena1*-GFP levels even further (Figure 5C). Interestingly, in yeast extract peptone dextrose (YEPD) medium *Ena1*-GFP was detectable in the wild type but not in the *chs5Δ* mutant (Supplemental Figure S2C), confirming the general lower abundance levels of *Ena1* in the exomer mutant. Altogether, these results suggested that exomer might have two functions with respect to *Ena1*: first, exomer could enhance expression of *Ena1* and, second, exomer might be required for polarized *Ena1* plasma membrane localization. Both possibilities are not mutually exclusive. The polarization coefficient would indicate that exomer is required for *Ena1* polarized localization, but we cannot rule out a transcriptional contribution.

Therefore, we investigated *Ena1*-GFP localization independently of its transcriptional regulation using the inducible promoter tetO

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

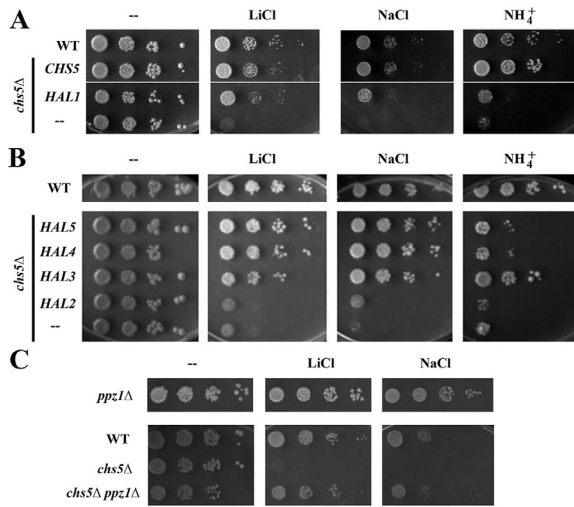


FIGURE 3: Multicopy suppression analysis by *HAL* genes. (A) Growth of the wild-type and *chs5Δ* strains transformed with the indicated genes on SD media supplemented with the indicated compounds. (B) Drop assays of *chs5Δ* transformed with different *HAL* genes. Wild-type strain is used as the control. In all cases, *HAL* genes were overexpressed from multicopy plasmids (YEp351 or Yep352). Cells were grown in selective SD to $\sim 2 \times 10^7$ cells/ml media and serially diluted before spotting onto YPD plates containing either 0.2 M LiCl, 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, or 1 M NaCl. Plates were incubated 2–3 d at 30°C. (C) Deletion of *PPZ1* rescues the *chs5Δ* growth defect on LiCl and NaCl plates. Drop assay with different strains. Plates were incubated 2–3 d at 30°C.

(Marques *et al.*, 2015). In this system, Ena1-GFP expression was regulated in a doxycycline (dox) concentration-dependent manner, in which 10 $\mu\text{g/ml}$ abolished Ena1-GFP expression and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ allowed some expression (Figure 5D). After 2 h of induction, levels of Ena1-GFP were similar in wild type and the *chs5Δ* mutant, inde-

pendent of the dox concentration (Figure 5D). We then determined Ena1-GFP localization after 2 h of growth in dox at concentrations of 10 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$. At high dox, Ena1-GFP is barely visible and the localization of the protein was similar in wild-type and *chs5Δ* strains (Figure 5E). NaCl stress-induced Ena1-GFP polarization was less efficient in *chs5Δ* cells, with a level that reached only $\sim 50\%$ when compared with wild type (Figure 5, E and F). Moreover, at 0.1 $\mu\text{g/ml}$ dox in the absence of saline stress, Ena1-GFP was observed neatly polarized in the wild-type cells ($40.3 \pm 7.8\%$), while *chs5Δ* cells showed a more uniform staining with less than 10% of the cells displaying a polarized Ena1-GFP distribution. Cationic treatment increased polarization not only in wild type but also in the *chs5Δ* mutant, which maintained reduced polarization levels of Ena1-GFP compared with the control (Figure 5F). Similar results were obtained when we determined the polarization coefficient for Ena1-GFP under a variety of conditions and in different strains (Supplemental Figure S3C). Altogether our results demonstrate the direct involvement of exomer in Ena1 polarization. It is worth noting that degradation of Ena1-GFP in the vacuole appeared minimal and indistinguishable between wild-type and *chs5Δ* mutants (see images and Supplemental Figure S2C), arguing against a direct effect of exomer on Ena1 recycling.

All previously described exomer cargoes show a strong polarized distribution (Figure 6), a hallmark that is also shared by Ena1. Therefore, we addressed whether the localization of other polarized proteins was affected in *chs5Δ*. However, neither the localization of the SNARE Snc1 nor of the osmosensor Sho1 was altered under those conditions (Figure 6). Another common feature shared between Chs3 and Ena1 is that they both require Sro7 for proper localization (Wadskog *et al.*, 2006; Zanolari *et al.*, 2011). Therefore, we tested whether other Sro7-dependent plasma membrane proteins (Forsmark *et al.*, 2011) would also be exomer-dependent cargoes. The hexose transporter Hxt7 and the glycerol symporter Stt1 localized indistinguishably in wild type and *chs5Δ*. Apparently exomer is involved in the polarized delivery of a restricted number of TM proteins. However, contrary to the other exomer cargoes described to date, Ena1 is still able to efficiently reach the PM in the absence of a functional exomer.

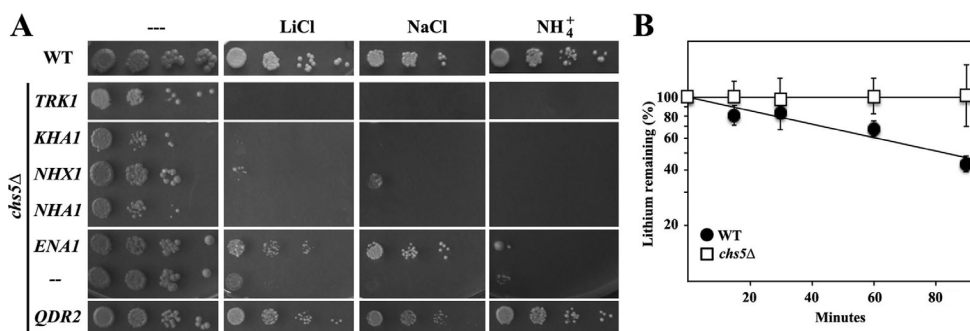


FIGURE 4: Effect of the overexpression of different ionic transporters on the *chs5Δ* phenotypes. (A) *chs5Δ* cells were transformed with the indicated genes expressed from multicopy plasmids, grown on selective SD media to 2×10^7 cells/ml, serially diluted and spotted onto the plates as in Figure 3. Growth was scored after 2 d at 30°C. Note the reduced sensitivity of the *chs5Δ* mutant to LiCl and NaCl, but not to $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, after *ENAI* overexpression, while high levels of *QDR2* improved growth on the three media. (B) Li^+ extrusion in the indicated strains. Cells were preloaded with Li^+ and transferred to fresh media. Cells were collected at the indicated times, and the internal amounts of Li^+ were measured by atomic absorption. Data are presented as the percentage of the original values of the strain at 0 time. The results are the average of three independent cultures. See *Materials and Methods* for details. Note the limited extrusion capacity of the *chs5Δ* mutant.

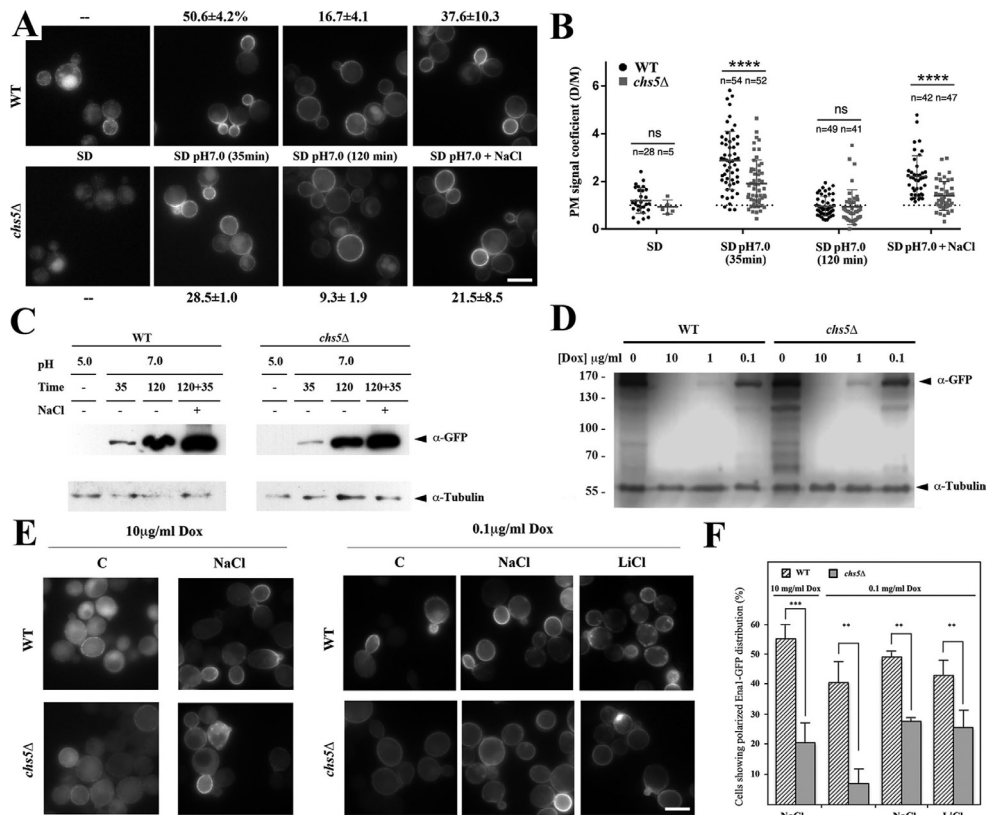


FIGURE 5: Assessing the role of exomer on Ena1 function. (A) Localization of a chromosomally tagged version of Ena1-GFP in wild type and *chs5Δ*. Cells were grown on selective SD media to logarithmic phase and then incubated under the indicated conditions. The percentage of cells showing polarized distribution of the fluorescence signal associated with Ena1-GFP is given as average values with standard deviations. (B) Polarization coefficients for any measured cell (n = number of cells) in the experiment described in A. See *Materials and Methods* for details. (C) Ena1-GFP levels before and after alkalinization of SD media under the same experimental conditions as in A. (D) Levels of Ena1-GFP expressed from the tetO promoter. Cells were grown in the presence of 10 mg/ml dox and transferred for 2 h to fresh media supplemented with the indicated concentrations of the drug. (E) Ena1-GFP was visualized by fluorescence microscopy after growth on the indicated dox concentration for 2 h. Cation treatment was performed for additional 30 min. (F) Levels of Ena1-GFP polarization in the same experiment. The results are the average of at least three independent experiments counting at least 50 cells in each experiment. Note the higher polarization of Ena1-GFP in wild type in all conditions tested. See also Supplemental Figure S3 for a complementary quantitative analysis on Ena1-GFP polarization.

Lack of exomer strongly reduces Rim101 processing and activation at neutral and alkaline pH

So far, we demonstrated that Ena1-GFP localization is altered in *chs5Δ* cells. However, we also observed a reduction of Ena1 protein levels in the exomer mutant, which is not explained by vacuolar degradation. Under the same conditions, the cellular concentration of Qdr2 was increased (Figure 2A), suggesting an opposite transcriptional control of the levels of Ena1 and Qdr2. Indeed, loss of the transcription factor Rim101 produced a similar deregulation effect on the expression of both *ENA1* and *QDR2* genes (Lamb and Mitchell, 2003). Rim101 positively regulates transcription of alkaline-expressed genes such as Ena1 (Lamb and Mitchell, 2003). To explore whether Chs5 impacts the transcriptional response triggered by Rim101, we first compared the sensitivity to alkali ions of the single and double mutants (Figure 7A). As expected, *chs5Δ* and *rim101Δ* shared sensitivities toward alkali metals and alkaline

growth medium, with *rim101Δ* being somewhat more sensitive. Combining both mutations exacerbated the phenotypes, indicating that they may act in parallel pathways. However, this result by itself does not exclude a potentially negative effect of *chs5Δ* on Rim101 function. Rim101 is activated at neutral-alkaline pH through proteolytic cleavage by the sequential action of several components of the RIM101 signaling pathway (Lamb *et al.*, 2001). Therefore, we assessed Rim101 processing in *chs5Δ*. In wild type, Rim101 is cleaved and thereby activated when the pH in the growth medium is raised from 5 to 7 (Figure 7B). In contrast, proteolytic activation of Rim101 was abolished in *chs5Δ* (Figure 7B). Thus, the *chs5Δ* cation sensitivity can be partially explained by the inability to activate the Rim101-dependent response.

Next, we addressed the mechanism by which lack of Chs5 abolishes Rim101 activation. The arrestin Rim8 is recruited to the PM by the pH sensor Rim21 (Herrador *et al.*, 2015), where it becomes

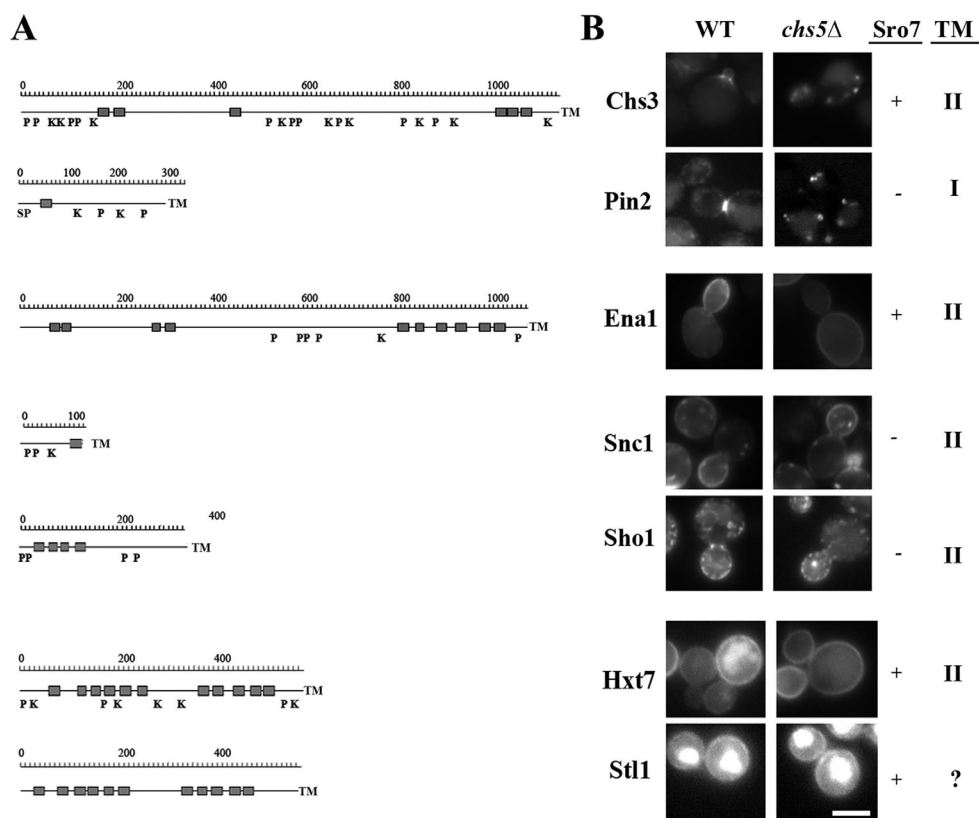


FIGURE 6: Localization of PM proteins in *chs5Δ* mutant cells. (A) Hydrophobic profiles of the indicated proteins showing predicted transmembrane domains (gray squares) and signal peptide (SP) sequences. The posttranslational modifications that have been experimentally described for these proteins are also indicated: P (phosphorylation) and K (ubiquitination). The profiles are drawn to approximate scale. (B) Representative images showing protein localization in wild-type and *chs5Δ* cells. The dependence of these proteins on Sro7 that has been previously described (Forsmark *et al.*, 2011) is indicated, as well as their predicted nature as Type I or II TM proteins. Chs3 and Pin2 have been described as bona fide exomer cargoes. Note how Ena1 polarization, but not PM arrival, is defective in the *chs5Δ* mutant. The absence of exomer did not affect the localization of the other proteins. See Figure 2A for additional images on other permeases.

ubiquitinated under alkaline conditions (Herranz *et al.*, 2005). In turn, ubiquitinated Rim8 recruits the ESCRT-I protein Vps23 to the PM (Herrador *et al.*, 2010; Galindo *et al.*, 2012), which triggers the recruitment of the processing machinery consisting of Rim20 and the protease Rim13 (Obara and Kihara, 2014) (reviewed in Peñalva *et al.* [2014]). Unfortunately, the fluorescent signals of Rim8-RFP and Vps23-GFP were too weak for proper analysis. We therefore determined the localization of Rim13 and Rim20 at acidic and alkaline pH. The number of Rim13/20 foci after alkalization of the media increased significantly in wild type but remained essentially unchanged in the *chs5Δ* mutant (Figure 7C and Supplemental Figure S4), explaining the poor processing of Rim101 in this mutant at pH 8.0. If our interpretation of these results was correct, then we would expect an alleviation of *chs5Δ* phenotypes on restoring Rim101 processing. To test this hypothesis, we expressed a constitutively processed form of Rim101 (Rim101^C [Lamb *et al.*, 2001]) that mimics the effect of alkali signaling. Under those conditions, we observed increased basal levels of Ena1-GFP in both wild-type and *chs5Δ* cells (Figure 7D). However, Rim101^C had only

a modest effect on the *chs5Δ* phenotypes (Figure 7E), whereas it suppressed more efficiently the phenotypes of the *rim13Δ* and *rim20Δ* mutants (Figure 7E), which are likewise defective in Rim101 processing (Hayashi *et al.*, 2005). These results indicate that while the defective processing of Rim101 could contribute to the phenotypes of the *chs5Δ* mutant, it is probably not the major cause for the sensitivity of exomer mutant to cations. Therefore, Chs5 must be involved in at least one other independent pathway regulating the response to cations.

Exomer is required for efficient Rim21 plasma membrane localization

These results, however, raised another question as to why exomer would be involved in Rim101 processing. One possibility is that exomer could be involved in the recruitment of Rim20/13 to the cortical foci, or, potentially, the transport of PM sensors like Rim21, which are part of the RIM101 signaling pathway might be perturbed. To distinguish between these possibilities, we addressed the behavior of Rim21 in the *chs5Δ* mutant. Rim21 levels were not affected at

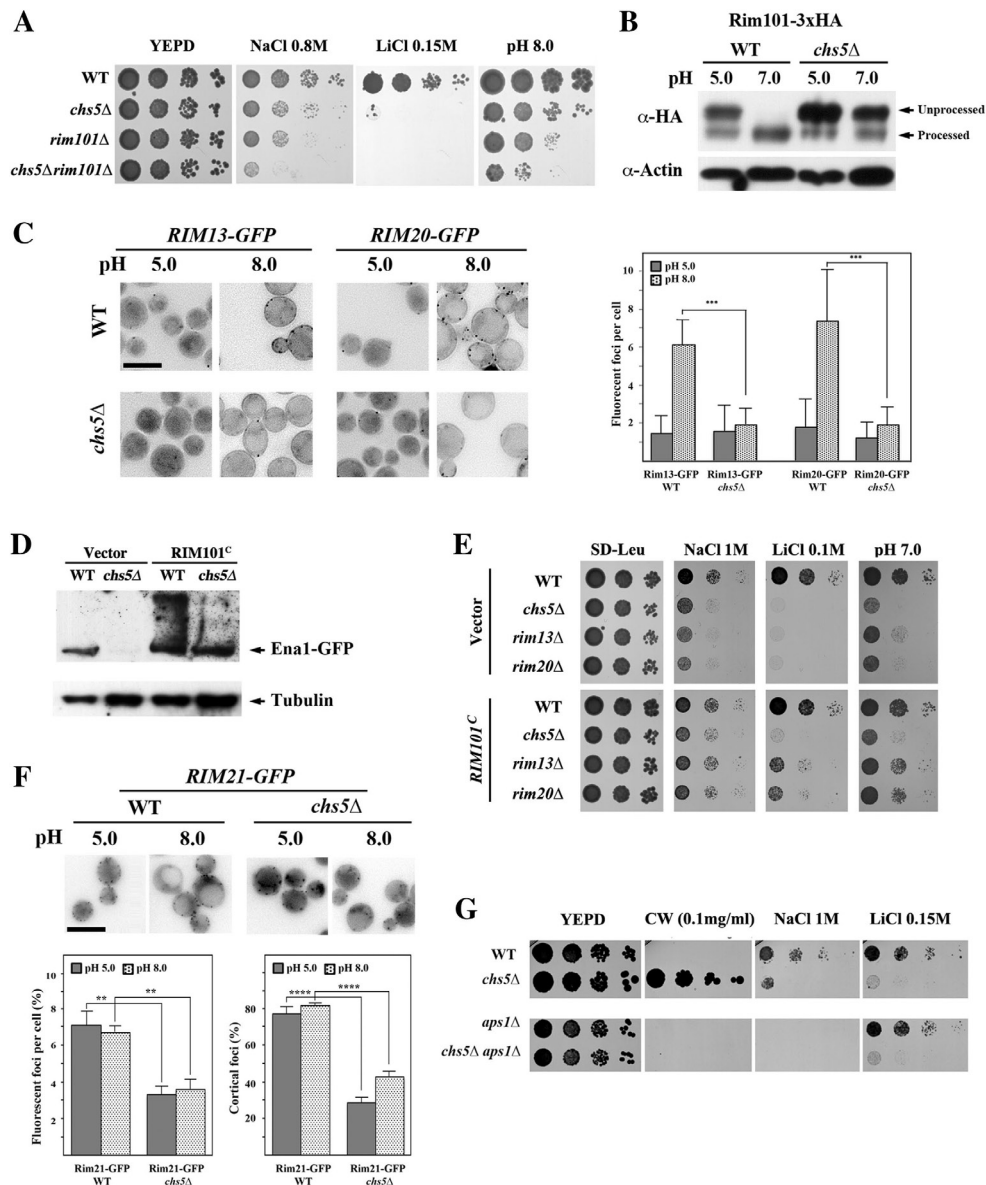


FIGURE 7: Defective RIM101 signaling in the exomer mutant. (A) Comparative phenotypes of *rim101Δ* and *chs5Δ* mutants. Note the similar phenotypes observed and the additive effect of both mutations. (B) Immunoblot of Rim101 proteolytic processing at the indicated pHs. Cells contain a modified version of Rim101 with an internal 3xHA tag. Note the absence of processing in the *chs5Δ* mutant compared with the control. (C) Visualization of processing spots using yeast cells containing chromosomally tagged versions of Rim13 and Rim20 proteins. Note the increasing numbers of spots for both proteins after alkalinization of the media for 1 h in wild type, which is absent in the *chs5Δ* mutant. Right panel shows the quantitative results for this experiment, which are the average of three independent experiments. (D) Levels of Ena1-GFP from its endogenous locus after expression of the constitutively processed Rim101^C from the pRS315 plasmid. Cells were grown O/N in selective SD media and refreshed in YEPD media for 2 h. (E) Drop assay of strains transformed with the constitutively expressed form of Rim101 (pRS315::RIM101^C) on the indicated media. Note the moderate improvement of growth promoted by Rim101^C in the *chs5Δ* mutant under all conditions tested. (F) Rim21-x2GFP localization in the indicated strains/conditions. Note the lower cortical localization of the protein in the *chs5Δ* mutant independently of the media pH. The quantitative results are the average of at least three independent experiments counting at least 120 cells in each experiment. (G) Phenotypes of the indicated mutants in different media. Note that the absence of Aps1 restores wild-type calcofluor sensitivity of the *chs5Δ* mutant but not its growth on Na⁺ or Li⁺ plates.

the different pHs in *chs5Δ* compared with wild type (see Supplemental Figure S4A). In contrast, Rim21-2xGFP fluorescent foci differed significantly between strains. Rim21-2xGFP was mostly localized as discrete spots in the cell periphery in wild type at either pH 5.0 or pH 8.0 (Figure 7F). By contrast, the number of Rim21-2xGFP spots in the *chs5Δ* mutant was reduced, and the spots were distributed throughout the cell volume in the *chs5Δ* mutants, showing a reduced association with the cell periphery (Figure 7F). Treatment with latrunculin A (LatA) to block endocytosis did not improve the numbers of cortical foci in the *chs5Δ* mutant (Supplemental Figure S4B), and these foci partially colocalized with the TGN marker Sec7 (Supplemental Figure S4C). These results suggest that Rim21 is at least partially retained at the TGN in the *chs5Δ* mutant, suggesting Rim21 localization might be dependent on exomer. Yet, all exomer-dependent cargoes described so far regain PM localization on AP-1 deletion, which was not the case for Rim21. The deletion of *APS1* has a minor effect on the cortical localization of Rim21-2xGFP foci (Supplemental Figure S4D). Nevertheless, *chs5Δ aps1Δ* mutant cells were still as sensitive as *chs5Δ* for growth on alkali metal-containing medium (Figure 7G), and Rim101 remained essentially unprocessed at alkaline pH in the double mutant (see Supplemental Figure S4E). Our results thus indicate that exomer is required for the efficient localization of the Rim21 sensor at the PM, which is essential for proper signaling by the RIM101 pathway.

DISCUSSION

Ena1, a potential new exomer cargo with distinct properties

Exomer is required for the delivery of several proteins to the PM, including Chs3, Fus1, and Pin2. However, none of these cargoes can be linked to the sensitivity to cationic compounds of exomer-deficient strains. In contrast, these sensitivities are observed in mutants of cation transporters such as Trk1/2 or Ena1-4. In addition, our multicopy suppression analysis revealed the ability of several *HAL* genes to suppress the sensitivity of the *chs5Δ* mutant toward alkali metal cations. Deletion of Ppz1/2 phosphatases, which act as negative regulators of halotolerance, also reduced the sensitivity of exomer mutants to Na⁺ or Li⁺ (see Figure 8A). Moreover, exomer mutants displayed a reduction in K⁺ influx resulting in reduced intracellular K⁺ levels. Consistently, high K⁺ concentrations suppressed the *chs5Δ* sensitivity to hygromycin (Figure 1B). However, external K⁺ had a minor effect on Na⁺/Li⁺ sensitivity, arguing against a direct defect in K⁺ transport as the major reason

for exomer sensitivity to alkali metal cations. Accordingly, overexpression of the K⁺ transporter Trk1 did not rescue the sensitivity of the *chs5Δ* to alkali metal cations. In contrast, overexpression of the efflux pumps Qdr2 and Ena1 effectively rescued this phenotype. Because overexpression of Qdr2 also alleviated the NH₄⁺ sensitivity of exomer deficiency, it is likely that the Qdr2 effect is a consequence of its activity as a general cation transporter with low specificity (Ríos et al., 2013).

Our data are most consistent with the model in which the Na⁺/Li⁺ sensitivity of *chs5Δ* is caused by the reduced activity of Ena1 at the plasma membrane. It is tempting to speculate that Ena1 may be a new exomer cargo because of its structural similarity to Chs3. However, Ena1 efficiently reaches the PM in the absence of exomer. Nevertheless, the polarized delivery of Ena1 is significantly reduced in the *chs5Δ* mutants (Figure 5, Supplemental Figure S3, and Figure 8B). We hypothesize that for Ena1 to act as a detoxifier it needs to be localized to the bud in order to protect the growing bud. The bud is particularly sensitive to any insult—such as Li⁺/Na⁺ stress—because the cell wall in this area is less rigid and less complex than in the mother. As a consequence, the effects of the alkali metals in cell integrity may be more severe in the bud than in the mother. It is also conceivable that Ena1 localization distinctly shields the bud from damage, considering that it is destined to become the young daughter after cell division. There is also a transcriptional component as Ena1 levels are lower in the *chs5Δ* mutant. Therefore, the combination of the reduced levels of the protein together with its altered distribution can explain the sensitivity of *chs5Δ* to alkali metal cations.

The role of exomer in Ena1 polarization as well as in the polarization of previously described bona fide cargoes, such as Fus1, Chs3, or Pin2, caused us to speculate that exomer may have a general role in the polarized delivery of TM proteins. However, neither Sho1 nor Snc1, as examples of other highly polarized TM proteins, showed altered localization in the *chs5Δ* mutant. Moreover, the dependence of both Chs3 and Ena1 on Sro7 on their transit to the PM did not seem to be mechanistically relevant because other TM proteins also transported through Sro7, such as Hxt7 or Stt1, showed normal localization in the exomer-deficient mutants. Furthermore, exomer function may be even more general. For example, Skg6, also localized in a polarized manner, can bind to the exomer complex in vivo and in vitro but is not dependent on exomer for polarized localization in rich medium (Ritz et al., 2014).

Hence, what would be the common characteristics for these proteins? There is no common trait in terms of amino acid sequence, topology, functional domains, and number of transmembrane domains. It appears as if there were several types of proteins whose traffic depends on exomer and that in a general sense they could be considered exomer cargoes. Bona fide cargoes are strictly dependent on exomer such as Chs3, Fus1, and Pin2. They require constant endocytosis and recycling through the TGN; examples are Skg6 (Ritz et al., 2014) and the here described Ena1. Our data point toward a more general role

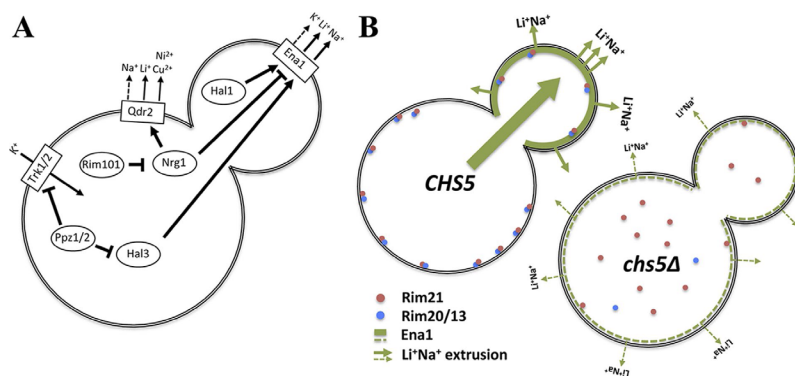


FIGURE 8: Scheme for exomer's role on Ena1 function. (A) Simplified scheme of the control of alkali metal cation transport across the PM in *S. cerevisiae*. (B) Exomer controls alkali metal cation sensitivity by directly controlling Ena1 polarization and indirectly controlling Ena1 levels through the activation of the RIM101 signaling pathway.

for exomer in polarized secretion, which is compatible with its previously described role as a dedicated cargo adaptor (Bonifacino, 2014; Paczkowski *et al.*, 2015). In this more general scenario for exomer function, we expect an increase in the numbers of proteins dependent on exomer for polarized PM localization to be described in the future.

Expanding exomer functionality at the TGN

In addition to functioning as a cargo adaptor, exomer may have additional roles. Ena1 protein levels were reduced in the *chs5Δ* mutant, which was accompanied by an increase of Qdr2 protein expression. These effects were a direct consequence of a deficient RIM101 signaling pathway caused by the poor processing of Rim101 protein in the *chs5Δ* mutant. Accordingly, *chs5Δ* and *rim101Δ* mutants share multiple phenotypes (Figure 7A). Moreover, expression of a constitutively processed form of Rim101 partially alleviated the Na⁺/Li⁺ sensitivity of the *chs5Δ* mutant.

Our results unambiguously showed a clear defect in the recruitment of the RIM101 processing machinery (see Figure 8B for a schematic summary), which may help to explain the improper processing of Rim101. In the *chs5Δ* mutant, the alkaline pH sensor Rim21 did not efficiently reach the PM, impeding the Rim20 and Rim13 recruitment to the PM after alkalization of the media. This failure prevents Rim101 proteolytic processing by the Rim13 protease and a reduction in RIM101 signaling, causing decreased Ena1 and increased Qdr2 levels. The simplest explanation for Rim21 mislocalization is that either Rim21 itself or one of its interaction partners, Dfg16 and Rim9, is an exomer cargo. However, deletion of AP-1 complex did not significantly improve Rim21 PM localization and Rim101 processing in the *chs5Δ* mutant. Furthermore, all exomer cargoes are localized in a polarized manner while the Rim21 complex does not have a polar distribution and may not require AP-1 recycling. Therefore, the possibility that at least one component of the Rim101 signaling complex could be an exomer cargo, although unlikely, remains open.

Alternatively, but not mutually exclusively, the defective recruitment of processing foci could be due to an aberrant TGN compartment organization in exomer mutants. Consistent with this possibility, *chs5Δ*, like multiple endosomal mutants, is sensitive to hygromycin and rapamycin (Figure 1 and Parsons *et al.* [2004] and Fell *et al.* [2011]). Moreover, *chs5Δ* genetically interacts with several *vps* mutants (Costanzo *et al.*, 2010), including *vps27Δ*, *vps24Δ* and several components of the retromer and CORVET complexes, highlighting an altered function of the late endosomal compartment in the absence of exomer. This function is fully in line with the previously proposed role of exomer at the TGN/EE boundary where, in addition to its role as cargo adaptor, it may amplify the membrane remodeling activity of the Arf1 GTPase. Impaired Arf1 GTPase activity has an important impact on the membranes of the TGN/EE boundary (Yahara *et al.*, 2001) and explains the phenotypes described. The expansion of the Golgi membrane in the *arf1-18* mutant (Yahara *et al.*, 2001) is reminiscent to the Golgi structure observed in an exomer/AP-1 double mutant in *Schizosaccharomyces pombe* (Hoya *et al.*, 2017), consistent with a role of Arf1 in exomer and AP-1-dependent transport.

In summary, our work describes new biological roles for the exomer complex at the TGN, expanding its function as a direct adaptor for a restricted number of bona fide cargoes to a more general one involved in the polarized secretion of multiple proteins. Both roles are equally compatible with the function of organizing a platform for loading cargo at the TGN, which would contribute to the proper traffic of many other proteins through the different

endosomal compartments. This function would be similar to the one of Sec16, for example, in organizing transitional ER exit sites (Kung *et al.*, 2012). Obviously, this also raises the possibility that this organizing function, apart from being a cargo adaptor, might be evolutionary conserved from the simplest form of exomer present in most fungi.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains construction

The yeast strains used throughout this work were made in the W303 or YPH499 genetic backgrounds as indicated in Table 1. Gene deletions were made using the gene replacement technique with different deletion cassettes based on *natMX4*, *kanMX4*, and *hphNT1* resistance (Goldstein and McCusker, 1999). Proteins were tagged chromosomally at their C-terminus with 3xHA or GFP, employing integrative cassettes amplified from pFA6a-3HA-hphMx6 or pFA6a-GFP-hphMx6, respectively (Sato *et al.*, 2005). *RIM21-2xGFP* construction was made using a specific set of primers and a plasmid with the cassette *2xGFP::kanMX4*. Whenever possible, GFP-tagged proteins were tested for functionality. In particular, chromosomally tagged Ena1-GFP was shown to be functional by testing the sensitivity of the corresponding strains to several stresses (Supplemental Figure S1A). Functionality of the pCM262::*ENA1-GFP* [tetO7-*ENA1-GFP::URA3*] construct has been previously reported (Marques *et al.*, 2015). The effect of different mutations on the localization of the tagged proteins were tested by deleting the corresponding genes on the strain contained the tagged protein to avoid the variability caused by potentially different versions of the tagged protein. The effects of the different mutations were always tested in two independent clones.

General methods for yeast handling have been previously described (Rose *et al.*, 1990). In brief, yeasts were transformed using the standard lithium acetate/polyethylene glycol procedure.

The plasmids used in this work are described in Table 2.

Media and growth assays

Yeast cells were grown at 28°C or 30°C in YEPD (1% Bacto yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or in SD medium (2% glucose, 0.7% Difco yeast nitrogen base without amino acids) supplemented with the appropriate amino acids. Medium was supplemented before pouring with different compounds at the concentration indicated for each experiment. In most cases, NaCl was added between 0.7 and 1.0 M, LiCl from 0.1 to 0.2 M, NH₄Cl from 0.1 to 0.2 M, and Calcofluor White from 0.01 to 0.3 mg/ml. Hygromycin was used between 40 and 100 µg/ml, and, when required, the pH of the media was adjusted with 50 mM phosphate buffer at pH 5.0 and 7.0 and Tris-HCl buffer to pH 8.0.

Drop tests

For assessment of the growth phenotypes, fresh cells of each tested strain were resuspended in water and adjusted to 1.0 OD₆₀₀. Ten-fold serial dilutions were prepared, and drops were spotted onto appropriate YEPD or SD agar plates supplemented as indicated in the text. Plates were incubated at 28°C for 2–5 d.

Gradient plates were prepared by successive pouring of two layers of media with different compositions. The first layer (containing the tested compound) was poured into a moderately inclined square Petri dish. After solidification, the plate was placed into a flat position, and the second layer (with the same composition, only without the inhibitory compounds) was poured on top (Maresova and Sychrova, 2005). In these experiments, the same dilution of the culture (OD₆₀₀ = 0.1) was spotted along the plate.

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Strain	Genotype	Origin/Reference
CRM67	W303, mat a, (<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>)	Lab collection
CRM2268	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4</i>	Lab collection
CRM2688	W303, mat a, <i>trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3</i>	Madrid et al. (1998)
CRM2689	W303, mat a, <i>ena1-4Δ::HIS3</i>	Yenush et al. (2002)
CRM1590	W303, mat a, <i>chs3Δ::natMx4</i>	Lab collection
CRM3056	W303, mat a, <i>rim101Δ::kanMx4</i>	This study
CRM2888	W303, mat a, <i>NHA1-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2896	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 NHA1-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM1278	W303, mat a, <i>chs3Δ::URA3 chs5Δ::natMx4</i>	Lab collection
CRM3119	W303, mat a, <i>HXT7-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM3121	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 HXT7-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM3117	W303, mat a, <i>STL1-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM3121	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 STL1-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM3058	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 rim101Δ::kanMx4</i>	This study
CRM3085	W303, mat a, <i>RIM101-3xHA::LEU2</i>	This study
CRM3086	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 RIM101-3xHA::LEU2</i>	This study
CRM3133	W303, mat a, <i>RIM21-2xGFP::kanMx4</i>	This study
CRM3153	W303, mat a, <i>RIM21-2xGFP::kanMx4 chs5Δ::natMx4</i>	This study
CRM3094	W303, mat a, <i>RIM13-GFP::kanMx4</i>	This study
CRM3096	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 RIM13-GFP::kanMx4</i>	This study
CRM3098	W303, mat a, <i>RIM20-GFP::kanMx4</i>	This study
CRM3100	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 RIM20-GFP::kanMx4</i>	This study
CRM3155	W303, mat a, <i>aps1Δ::kanMx4</i>	This study
CRM3157	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 aps1Δ::kanMx4</i>	This study
CRM2406	W303, mat a, <i>PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2507	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM3198	W303, mat a, <i>RIM101-3xHA::LEU2 aps1Δ::hphNT1</i>	This study
CRM3191	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 RIM101-3xHA::LEU2 aps1Δ::hphNT1</i>	This study
YAS2157	YPH499, <i>QDR2-GFP::TRP1</i>	This study
YAS2158	YPH499, <i>QDR2-GFP::TRP1 chs5Δ::LEU2</i>	This study
YAS2202	YPH499, <i>ENA1-GFP::TRP1</i>	This study
YAS2241	YPH499, <i>ENA1-GFP::TRP1 chs5Δ::LEU2</i>	This study
CRM3159	YPH499, <i>ENA1-GFP::TRP1 chs5Δ::natMx4</i>	This study
YAS563-16a	YPH499, <i>bch1Δ::HIS5 (S. pombe) bch2Δ::KAN (Tn 903) bud7Δ::LEU2 (K. lactis) chs6Δ::URA3 (K. lactis)</i>	Trautwein et al. (2006)
YAS563-5a	YPH499, <i>bch1Δ::HIS5 (S. pombe)</i>	Trautwein et al. (2006)
YAS1974	YPH499, <i>ppz1Δ::HIS5 (S. pombe)</i>	This study
YAS1975	YPH499, <i>ppz1Δ::HIS5 (S. pombe) chs5Δ::LEU2</i>	This study
YPH499	Mat a, <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Spang lab
YAS431	YPH499, <i>chs5Δ::LEU2</i>	Spang lab
CRM3273	W303, mat a, <i>RIM21-2xGFP::kanMx4 SEC7-mRuby2::URA3</i>	This study
CRM3274	W303, mat a, <i>RIM21-2xGFP::kanMx4 SEC7-mRuby2::URA3 chs5Δ::natMX4</i>	This study
FCM603	W303, mat a, <i>RIM13::natMx4</i>	Lab collection
CRM3381	W303, mat a, <i>vps27Δ::kanMx4 chs5Δ::natMX4</i>	This study
CRM3382	W303, mat a, <i>vps27Δ::kanMx4</i>	This study

TABLE 1: Yeast strains used.

Plasmid	Genotype	Origin/Reference
CRM2684	pRS414::TRK1-GFP	Yenush et al. (2005)
CRM2686	pCM262::ENA1-GFP [tetO7-ENA1-GFP::URA3]	Marques et al. (2015)
CRM1598	pR315::CHS3-GFP	Sacristan et al. (2013)
CRM1715	pRS315::GFP-SNC1	Spang lab
CRM1855	pRS416::SHO1-GFP	F. Posas, Universidad Pompeu Fabra, Spain
CRM3075	pKR41::RIM101-3xHA::LEU2	Rothfels et al. (2005)
FCM129	pWL86 [pRS314::RIM101C ⁵³¹]	Li and Mitchell (1997)
FCM591	pRS315:: RIM101C ⁵³¹	Lab collection
CRM2071	pYM38::2xGFP-kanMx4	R. Wedlich-Söldner, University of Muenster, Germany
RS702	yEP351::HAL1	Rios et al. (1997)
JRM5	yEP351::HAL2	Murguia et al. (1996)
RS1068	yEP351::HAL3	Ferrando et al. (1995)
PM73	yEP351::HAL4	Mulet et al. (1999)
PM89	yEP351::HAL5	Mulet et al. (1999)
pRG296-2	pGN621::TRK1	Gaber et al. (1988)
JM1	yEP351::KHA1	This study
JM3	yEP351::NHX1	This study
JM4	yEP351::NHA1	This study
YAS1254	YEp24::ENA1	Ferrando et al. (1995)
PM71	yEP351::QDR2	Rios et al. (2013)

TABLE 2: Plasmids used.

Multicopy suppressor screen

One hundred nanograms of a Yep24 genomic plasmid library (Carlson and Botstein, 1982) was transformed into *chs5Δ* cells using the LiAc method. For this experiment, aliquots were plated out on either Hartwell's Complete minus uracil (HC-URA) or YEPD 0.2 M LiCl plates and incubated at 30°C. The next day, colonies from HC-URA plates were replica plated onto YEPD 0.2 M LiCl plates and YEPD 0.2 M LiCl-derived colonies onto HC-URA. Colonies from both regimes were replica plated onto HC-URA and YEPD 0.2 M LiCl plates. Colonies that grew on both plates were expanded, and the plasmids were isolated and sequenced.

K⁺ content of cells and Rb⁺/Li⁺ transport experiments

The time course of Rb⁺ uptake of actively growing cells was studied in YEPD media as described (Mulet and Serrano, 2002). When the OD₆₀₀ of the culture reached values of 0.3, RbCl (50 mM) was added to the medium (time zero), and cell samples were removed at various times afterward for the intracellular determination of Rb⁺. Intracellular K⁺ was determined in logarithmically growing cells in YEPD.

For the determination of intracellular levels of Rb⁺/K⁺ cells were grown as indicated above, collected by centrifugation, and washed twice with 10 ml of an ice-cold 20 mM MgCl₂ solution. The cell pellets were finally resuspended in 0.5 ml of the same 20 mM MgCl₂ solution. Ions were extracted by heating the cells for 15 min at 95°C. After centrifugation, aliquots of the supernatant were analyzed with an atomic absorption spectrometer (SensAA) in flame emission mode.

For the Li⁺ extrusion experiments, cells were grown to an OD₆₀₀ of 0.6, collected by centrifugation and transferred to fresh YEPD containing 0.2 M LiCl. After 4 h incubation, cells were centrifuged, washed twice with a 20 mM MgCl₂ solution, and transferred to fresh

YEPD. Aliquots were taken at the indicated times. Sample treatment and lithium determination were performed as for the Rb⁺/K⁺ experiments.

Fluorescence microscopy

Yeast cells expressing GFP-tagged proteins were grown to early logarithmic phase in SD medium supplemented with 0.2% adenine. Living cells were visualized directly by fluorescence microscopy.

Most of the images were obtained using a Nikon 90i epifluorescence microscope (100× objective, NA: 1.45), equipped with a Hamamatsu ORCA ER digital camera, and by using a 49002 ET-GFP (FITC/Cy2) and 49005 ET-DsRed (TRITC/Cy3) filters (Chroma Technology Corp). The images were then processed using the ImageJ software (NIH) and mounted with Adobe Photoshop CS5 (San José, CA) software. All images shown in each series were acquired under identical conditions and processed in parallel to preserve the relative intensities of fluorescence for comparative purposes. In all figures, the white scale bar represents 5 μm.

Where appropriate, image measurements were statistically analyzed using the t test for unpaired data. Analyses were performed using the GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA) software. Significantly different values ($p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$) are indicated (*, **, ***).

Quantification of the Ena1-GFP polarization

To obtain an unbiased measurement of the cellular polarization of Ena1-GFP, we determined the daughter/mother plasma membrane signal coefficient (polarization coefficient) at every single cell. Intensities were measured on raw images with FIJI software (ImageJ) by drawing a line along the cell contour (*Freehand Line*, *8 Line Width*)

and acquiring the average intensity value (*Analyze/measure*); an intensity value was obtained for every mother and daughter cell (the bud). Measurements were only performed at budded cells following the schemes represented (Supplemental Figure S2A) depending on the size of the bud. The background average intensity in the cell proximity for every single cell was subtracted. After the background subtraction, the daughter/mother polarization coefficient was calculated for every cell, $C = D/M$.

Colocalization of Rim21-2xGFP with Sec7-mR2 positive structures

Quantification was performed in FIJI software (ImageJ) as follows. First, both green and red channels were prefiltered with a dedicated macro to eliminate most of the background. Then a threshold was manually adjusted for Sec7-mR2 images before loading Sec7-mR2 regions of interest (ROIs) at ROI Manager (*Image/Adjust/Threshold, Analyze/Analyze Particles, Size 6-1000, Circularity 0-1*). After that, the Sec7-mR2 ROIs were overlapped to the pre-filtered Rim21-2xGFP images and the colocalization of Rim21 particles with Sec7 ROIs was manually accounted with the cell counter tool (*Plugins/Analyze/Cell Counter*). Note that Rim21-2xGFP ROIs were not acquired because Rim21-2xGFP signal was too dim to obtain an accurate threshold.

Protein extracts and immunoblotting

Total cell lysates were prepared by resuspending cells obtained from the 30-ml logarithmic cultures in 150 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% Triton, 150 mM NaCl) containing 1 \times protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 1 μ g ml⁻¹ aprotinin, 1 μ g ml⁻¹ leupeptin, 1 μ g ml⁻¹ pepstatin A). Cells were disrupted using glass beads (0.45 mm, SIGMA) during three pulses of 15 s each with an intensity of 5.5 units in a Fast prep (FP120, BIO101). Cell debris was eliminated by centrifugation (5 min, 10,000 \times g, 4°C) and the resultant supernatant was boiled for 5 min with 4 \times sample buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 40% glycerol, 4% β -mercaptoethanol); 100 μ g of protein per sample was used.

For visualizing Ena1-GFP and Rim21-2xGFP in Western blot experiments, the trichloroacetic acid (TCA) protocol was used. To do this, the same OD₆₀₀ of cells from the logarithmic cultures was processed for each sample, and the entire procedure was carried out on ice until the boiling step. Cells were centrifuged, resuspended in 20% TCA, and frozen for at least 3 h. The samples were then thawed and the centrifuged cells were disrupted in 1.5-ml tubes with 100 μ l of 20% TCA and glass beads (0.45 mm; Sigma) during three pulses of 15 s with an intensity of 5.5 in a Fast prep (FP120, BIO101). Extracts were transferred to new tubes, and 5% TCA was added to the extracts up to final TCA concentration of ~10%. Precipitated proteins were then collected by centrifugation at 900 \times g for 10 min and the supernatant was completely discarded. Then 50 μ l of 2 \times sample buffer was added (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 25 mM dithiothreitol (DTT), and traces of bromophenol blue) and vortexed, and an additional 50 μ l of 2 M Tris-HCl, pH 7.5, was added. The extracts were boiled for 5 min and centrifuged for 5 min at 15,000 \times g. The supernatant was collected, and 15 μ l was used for Western blot analysis.

Both types of extracts were separated on 7.5% SDS-PAGE (6.5% for Rim21-2xGFP) and transferred onto PVDF membranes (Trilla *et al.*, 1999). The membranes were blocked with skimmed milk and incubated with the corresponding antibodies: anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (Living colors; Clontech), anti-HA 12CA5 (Roche), anti-tubulin (T5162; Sigma), depending on the experiments. Blots were developed using the ECL kit (Advanta).

For determining Rim101 expression, cells growing logarithmically in selective SD media were transferred at an OD₆₀₀ of 0.4 into fresh SD media (pH 5.0 and 7.0) and incubated for an additional 3 h and then processed as indicated above.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge Emma Keck for English language revision. We also thank members of the Translucent group, J. Ariño, J. Ramos, and L. Yenush, for many useful discussions throughout this work and especially L. Yenush for her generous gift of strains and reagents. The help of O. Vincent was essential for developing the work involving RIM101. We also thank R. Valle for her technical assistance at the CR Laboratory. M. Trautwein is acknowledged for data acquisition and discussions during the early stages of the project. C.A. is supported by a USAL predoctoral fellowship. Work at the Spang laboratory was supported by the University of Basel and the Swiss National Science Foundation (31003A-141207 and 310030B-163480). C.R. was supported by grant SA073U14 from the Regional Government of Castilla y León and by grant BFU2013-48582-C2-1-P from the CICYT/FEDER Spanish program. J.M.M. acknowledges the financial support from Universitat Politècnica de Valencia project PAID-06-10-1496.

REFERENCES

- Ariño J, Ramos J, Sychrová H (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 95–120.
- Bard F, Malhotra V (2006). The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 439–455.
- Barfield RM, Fromme JC, Schekman R (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* 20, 4985–4996.
- Bonifacino JS (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol* 204, 7–17.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116, 153–166.
- Bonifacino JS, Lippincott-Schwartz J (2003). Coat proteins: shaping membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 409–414.
- Carlson M, Botstein D (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145–154.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, *et al.* (2010). The genetic landscape of a cell. *Science* 327, 425–431.
- De Matteis MA, Luini A (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 273–284.
- de Nadal E, Clotet J, Posas F, Serrano R, Gomez N, Ariño J (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 7357–7362.
- Drubin DG, Nelson WJ (1996). Origins of cell polarity. *Cell* 84, 335–344.
- Fell GL, Munson AM, Croston MA, Rosenwald AG (2011). Identification of yeast genes involved in k homeostasis: loss of membrane traffic genes affects k uptake. *G3 (Bethesda)* 1, 43–56.
- Ferrando A, Kron SJ, Rios G, Fink GR, Serrano R (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene HAL3. *Mol Cell Biol* 15, 5470–5481.
- Forsmark A, Rossi G, Wadskog I, Brennwald P, Warringer J, Adler L (2011). Quantitative proteomics of yeast post-Golgi vesicles reveals a discriminating role for Sro7p in protein secretion. *Traffic* 12, 740–753.
- Gaber RF, Styles CA, Fink GR (1988). TRK1 encodes a plasma membrane protein required for high-affinity potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8, 2848–2859.
- Galindo A, Calcagno-Pizarelli AM, Arst HNJ, MÁ Peñalva (2012). An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* 124, 1784–1795.
- Goldstein AL, McCusker JH (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541–1553.

- Hayashi M, Fukuzawa T, Sorimachi H, Maeda T (2005). Constitutive activation of the pH-responsive Rim101 pathway in yeast mutants defective in late steps of the MVB/ESCRT pathway. *Mol Cell Biol* 25, 9478–9490.
- Herrador A, Herranz S, Lara D, Vincent O (2010). Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol* 30, 897–907.
- Herrador A, Livas D, Soletto L, Becuwe M, León S, Vincent O (2015). Casein kinase 1 controls the activation threshold of an α -arrestin by multisite phosphorylation of the interdomain hinge. *Mol Biol Cell* 26, 2128–2138.
- Herranz S, Rodríguez JM, Bussink HJ, Sánchez-Ferrero JC, Arst HNJ, Peñalva MA, Vincent O (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 12141–12146.
- Hoya M, Yanguas F, Moro S, Prescianotto-Baschong C, Doncel C, de León N, Curto MA, Spang A, Valdivieso MH (2017). Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics* 205, 673–690.
- Huranova M, Muruganandam G, Weiss M, Spang A (2016). Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep* 17, 202–219.
- Kung LF, Pagant S, Futai E, D’Arcangelo JG, Buchanan R, Dittmar JC, Reid RJ, Rothstein R, Hamamoto S, Snapp EL, et al. (2012). Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *EMBO J* 31, 1014–1027.
- Lamb TM, Mitchell AP (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes *NRG1* and *SMP1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 677–686.
- Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP (2001). Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the *RIM101* pathway. *J Biol Chem* 276, 1850–1856.
- Li W, Mitchell AP (1997). Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* 145, 63–73.
- Madrid R, Gómez MJ, Ramos J, Rodríguez-Navarro A (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J Biol Chem* 273, 14838–14844.
- Maresova L, Sychrova H (2005). Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *kha1* deletion mutants. *Mol Microbiol* 55, 588–600.
- Marques MC, Zamarbide-Fores S, Pedelini L, Llopis-Torregrosa V, Yenush L (2015). A functional Rim101 complex is required for proper accumulation of the Ena1 Na⁺-ATPase protein in response to salt stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 15, fov017.
- Mulet JM, Leube MP, Kron SJ, Rios G, Fink GR, 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. *Mol Cell Biol* 19, 3328–3337.
- Mulet JM, Serrano R (2002). Simultaneous determination of potassium and rubidium content in yeast. *Yeast* 19, 1295–1298.
- Murguía JR, Belles JM, Serrano R (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J Biol Chem* 271, 29029–29033.
- Obara K, Kihara A (2014). Signaling events of the Rim101 pathway occur at the plasma membrane in a ubiquitination-dependent manner. *Mol Cell Biol* 34, 3525–3535.
- Paczkowski JE, Fromme JC (2014). Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev Cell* 30, 610–624.
- Paczkowski JE, Richardson BC, Fromme JC (2015). Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol* 25, 408–416.
- Paczkowski JE, Richardson BC, Strassner AM, Fromme JC (2012). The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J* 31, 4191–4203.
- Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* 22, 62–69.
- Peñalva MA, Lucena-Agell D, Arst HNJ (2014). Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. *Curr Opin Microbiol* 22, 49–59.
- Perlin DS, Brown CL, Haber JE (1988). Membrane potential defect in hygromycin B-resistant *pma1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 263, 18118–18122.
- Rios G, Cabedo M, Rull B, Yenush L, Serrano R, Mulet JM (2013). Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res* 13, 97–106.
- Rios G, Ferrando A, Serrano R (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 515–528.
- Ritz AM, 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 Rep* 10, 249–260.
- Rockenbauch U, Ritz AM, Sacristan C, Roncero C, Spang A (2012). The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Mol Biol Cell* 23, 4404–44015.
- Roncero C (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* 41, 367–378.
- Roncero C, Sanchez-Diaz A, Valdivieso MH (2016). Chitin synthesis and fungal morphogenesis. In: *The Mycota III: Biochemistry and Molecular Biology*, ed. D Hoffmeister, Berlin: Springer, 167–190.
- Rose MD, Wisnton F, Hieter P (1990). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rothfels K, Tanny JC, Molnar E, Friesen H, Commisso C, Segall J (2005). Components of the ESCRT pathway, DFG16, and YGR122w are required for Rim101 to act as a corepressor with Nrg1 at the negative regulatory element of the DIT1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25, 6772–6788.
- Sacristan C, Manzano-Lopez J, Reyes A, Spang A, Muniz M, Roncero C (2013). Dimerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol* 90, 252–266.
- Santos B, Snyder M (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* 136, 95–110.
- Sato M, Dhut S, Toda T (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 582–591.
- Schekman R, Orci L (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526–1533.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, et al. (2006). Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol Cell* 21, 319–330.
- Spang A (2008). The life cycle of a transport vesicle. *Cell Mol Life Sci* 65, 2781–2789.
- Starr TL, Pagant S, Wang CW, 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, e46386.
- 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 J* 25, 943–954.
- Trilla JA, Duran A, Roncero C (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 145, 1153–1163.
- Valdivia RH, Baggot D, Chuang JS, Schekman R (2002). The yeast Clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* 2, 283–294.
- Wadskog I, Forsmark A, Rossi G, Konopka C, Oyen M, Goksör M, Ronne H, Brennwald P, Adler L (2006). The yeast tumor suppressor homologue Sro7p is required for targeting of the sodium pumping ATPase to the cell surface. *Mol Biol Cell* 17, 4988–5003.
- Wang CW, 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. *J Cell Biol* 174, 973–983.
- Weiskoff AM, Fromme JC (2014). Distinct N-terminal regions of the exomer secretory vesicle cargo Chs3 regulate its trafficking itinerary. *Front Cell Dev Biol* 2, 47.
- Yahara N, Ueda T, Sato K, Nakano A (2001). Multiple roles of Arf1 GTPase in the yeast exocytic and endocytic pathways. *Mol Biol Cell* 12, 221–238.
- Yenush L, Merchan S, Holmes J, Serrano R (2005). pH-Responsive, post-translational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol Cell Biol* 25, 8683–8692.
- Yenush L, Mulet JM, Ariño J, Serrano R (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J* 21, 920–929.
- Zanolari B, Rockenbauch U, Trautwein M, Clay L, Barral Y, Spang A (2011). Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 124, 1055–1066.

CAPÍTULO 2:

El exómero en perspectiva evolutiva

Anton, C., Valdez Taubas, J., and Roncero, C. (2018). The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi. *Genetics* 208 (4), 1483–1498.

Ramirez-Macias, I., Barlow, L.D., Anton, C., Spang, A., Roncero, C., and Dacks, J.B. (----) Evolutionary cell biology traces the rise of exomer complex function in Fungi from an ancient eukaryotic component. En revisión.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Estudios previos al desarrollo de esta tesis describían al exómero como un complejo adaptador de carga, que en *S. cerevisiae* media el transporte polarizado de un pequeño grupo de proteínas desde el compartimento trans-Golgi (TGN)/endosomas tempranos (EE) hasta la membrana plasmática (PM). En ausencia del complejo, las proteínas quedaban totalmente bloqueadas en el TGN/EE. Este papel de adaptador de carga ha sido extensamente documentado para el cargo Chs3, para el que uno de los ChAPs actuaría como adaptador específico (Paczkowski et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012). Sin embargo, durante el desarrollo de esta tesis se ha ido describiendo para el exómero un papel más amplio, donde mediaría la correcta localización de otras proteínas (Anton et al., 2017), así como su participación en el funcionamiento general del compartimento TGN/EE en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Hoya et al., 2017). Estos nuevos datos ampliarían el papel funcional del exómero, que además de hacer las veces de adaptador de carga, también mediaría funciones más generales en el TGN/EE que podrían modular la localización de un mayor abanico proteico.

Al inicio de esta tesis doctoral, un proyecto independiente llevado a cabo en el laboratorio del profesor Javier Valdéz Taubas, enfocado a la búsqueda de modificaciones post-traduccionales de Chs3, aisló varios genes que al sobreexpresarlos generaban resistencia a calcoflúor. Entre estos estaba *YKRO27W*, gen codificante para el ChAP Bch2. Fue en este punto cuando decidimos profundizar en las diferencias estructurales y funcionales de los ChAPs, y lo que posteriormente nos llevó al estudio evolutivo del exómero.

RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Especialización del exómero como adaptador de carga en el clado Saccharomycotina

La sobreexpresión de *BCH2* altera la síntesis de quitina confiriendo resistencia al calcoflúor. Cuando hay un exceso de Bch2 en la célula, este desplaza al ChAP Chs6 a la hora de conformar el exómero, bloqueando así el transporte de Chs3 en el TGN/EE. Además, la sobreexpresión de Bch2 confería una moderada sensibilidad al amonio, función dependiente de los ChAPs Bch1/Bud7. Sin embargo, la sobreexpresión del resto de los ChAPs no tenía efectos deletéreos sobre la célula.

Los efectos de la sobreexpresión de Bch2 son dependientes de una región de unión a dominios SH3 (Tonikian et al., 2009), exclusiva del ChAP Bch2. Dichos efectos se ejercen fundamentalmente sobre Chs6 debido a la alta homología presente entre ambas proteínas, que a lo largo de la evolución se habrían especializado como adaptadores de carga perdiendo a su vez la capacidad de deformar membranas presente en los ChAPs Bch1/Bud7 (Huranova et al., 2016; Paczkowski and Fromme, 2014). Así, por su alta especialización, Bch2 no sería capaz de desplazar completamente del TGN/EE a los ChAPs Bch1/Bud7, pero sí al ChAP con menor distancia evolutiva Chs6. En base a todo esto, Bch2 habría adquirido unas funciones únicas a la vez que habría mantenido parcialmente otras compartidas con otros ChAPs.

Estas peculiaridades únicas de los distintos ChAPs presentes en *S. cerevisiae* nos hicieron preguntarnos acerca de cuál sería la estructura y función conservada del exómero en la evolución. El análisis filogenético de los ChAPs en otras especies evidenció que fuera del grupo Saccharomycotina hay un único ChAP, mientras que dentro de él, y fruto de una duplicación génica, la mayoría de las especies tienen 2 genes, y en el caso del género *Saccharomyces* aparecen 4 ChAPs, fruto de la

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

duplicación global del genoma que sufrió dicho género (WGD).

La función de adaptador de carga en *S. cerevisiae* parece estar ligada a la rama de ChAPs Bch2/Chs6, que apareció posteriormente en la evolución como consecuencia de la primera duplicación en el ancestro del clado Saccharomycotina. De los cargos descritos para el exómero solo Chs3 está altamente conservado en otras especies de hongos (Roncero, 2002), por esta razón, decidimos estudiar la relación exómero-Chs3 en otros hongos. Sorprendentemente, el transporte de Chs3 a la MP, al contrario que en *S. cerevisiae*, no es dependiente del exómero ni en *Ustilago maydis*, ni en *Candida albicans* ni en *Kluyveromyces lactis*, como demuestran sus niveles silvestres de quitina.

Analizando otros fenotipos descritos previamente en *S. cerevisiae*, vimos que además de una ligera hipersensibilidad a la rapamicina en los mutantes de todas las especies, solo estaba conservada la hipersensibilidad al litio y a la higromicina en los mutantes de *K. lactis*. Analizando los ChAPs, en *S. cerevisiae*, la sensibilidad al litio está ligada a la función de la rama Chs6/Bch2, mientras que la sensibilidad a la higromicina está ligada a la función de Bch1/Bud7. Sin embargo, en *K. lactis*, a pesar de tener homólogos a Chs6 y Bch1, no existe tal especialización de las ramas de ChAPs, siendo necesaria la eliminación de ambas ramas para obtener un fenotipo de hipersensibilidad a cualquiera de los compuestos. Estos datos apuntan a una especialización de las funciones de los ChAPs exclusiva de *S. cerevisiae*. Por otro lado, el análisis en profundidad de los mutantes del exómero de *K. lactis*, evidenció un crecimiento lento en medio YEPD y una ausencia de crecimiento en medio YES. Ambos fenotipos probablemente relacionados con la sensibilidad al amonio del mutante del exómero en *S. cerevisiae* o con la hipersensibilidad a rapamicina.

Finalmente, examinando en profundidad la síntesis de quitina en *C. albicans*, observamos que Chs3 de *C. albicans* (CaChs3) en el mutante carente del exómero, aun siendo capaz de llegar a la MP, presentaba una pérdida de polarización y una mayor retención en compartimentos intracelulares. Lo que apuntaba a una conservación parcial de la función del exómero en el transporte polarizado de proteínas. Con el fin de ahondar en el porqué de estas diferencias entre *S. cerevisiae* y *C. albicans* (solo existe bloqueo total de la proteína en *S. cerevisiae*), llevamos a cabo un análisis *in silico* de las secuencias de varios ortólogos de Chs3 de *S. cerevisiae* (ScChs3). ScChs3 presenta los extremos C-terminal y N-terminal proyectados hacia el citoplasma (colas citosólicas), a través de los cuales interacciona con los complejos AP-1 y exómero (Rockenbauch et al., 2012; Starr et al., 2012). Al comparar los ortólogos de ScChs3 de varias especies, incluida CaChs3, se evidenció una baja conservación de las colas citosólicas, lo cual podría explicar el comportamiento diferencial de ambas proteínas quitín sintasa. Con el fin de corroborar este análisis estructural, expresamos en *S. cerevisiae* proteínas híbridas ScChs3/CaChs3 donde reemplazamos o bien el dominio N-terminal, o bien el dominio C-terminal de ScChs3 por los de CaChs3. El análisis de estas construcciones en la cepa silvestre, así como en cepas carentes del exómero o del complejo AP-1, reafirmó los datos obtenidos *in silico*. Al parecer, en *S. cerevisiae*, ScChs3 presenta colas citosólicas únicas que le permiten interactuar directamente con los complejos exómero y AP-1, situación que hace a la proteína ScChs3 totalmente dependiente del exómero para eludir la retención en el TGN/EE que ejerce el complejo AP-1 en esta levadura.

Este estudio evidencia una especialización en las funciones del exómero a lo largo de la evolución del grupo Saccharomycotina, fruto de la duplicación y posterior divergencia de los ChAPs. Además, la pérdida de polaridad de los homólogos a los cargos del exómero de *S. cerevisiae* en el mutante de

C. albicans, junto a la conservación de algunos de los fenotipos, apuntan al transporte polarizado de proteínas transmembrana como la función conservada del exómero, al menos en el clado Saccharomycotina.

El exómero: origen evolutivo, distribución y conservación

En base a los datos presentados en el punto anterior y en estudios previos, y en colaboración con los grupos de los Profesores Joel B. Dacks y Anne Spang, se decidió analizar en profundidad el carácter evolutivo del exómero y sus subunidades. Para ello, se llevó a cabo un estudio exhaustivo *in silico* con herramientas avanzadas de comparación de secuencias así como un análisis funcional mediante expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.

Este análisis exhaustivo corroboró nuestros resultados previos acerca de la generación de los 4 ChAPs en *S. cerevisiae*. Una duplicación previa a la aparición del grupo Saccharomycotina generó dos ramas de ChAPs Bch1/Bud7 (1 + 7 = **BB8**) y Bch2/Chs6 (2 + 6 = **BC8**). Dentro de este grupo y fruto de la duplicación global del genoma que dio lugar al género *Saccharomyces* tuvo lugar la duplicación de ambas ramas (4 ChAPs). La comparación de las secuencias de los ChAPs de *S. cerevisiae* con los ChAPs presentes en especies que no han sufrido la primera duplicación, evidenció una divergencia significativa de la rama BC8, no así de BB8. Estos resultados, junto a la asunción de que la conservación de parálogos con divergencia de secuencias refleja divergencia funcional, sugieren que esta primera duplicación ha permitido una neo-funcionalización de la rama BC8, que estarían en consonancia con nuestros anteriores resultados (Anton et al., 2018).

Los dominios BRCT y FN3 de Chs5 por separado, están presentes en proteínas fuera del clado Fungi. Sin embargo, la proteína como tal no presenta ortólogos fuera de este grupo. En cambio, la proteína ChAP parece estar presente en varios grupos de eucariotas habiéndose perdido en grupos importantes como Metazoa y Embryophyta. Esta distribución señala la proteína ChAP como un elemento presente en el último ancestro común Eucariota (LECA) que se ha perdido en varios grupos. Probablemente, la reordenación de dominios justo al comienzo de la aparición del clado Fungi haya generado la proteína Chs5, una proteína capaz de interactuar tanto con Arf1 como con ChAPs, dando lugar al complejo del exómero.

Con el fin de evidenciar la existencia del exómero como un complejo proteico en otras especies, decidimos estudiar las funciones de varios ortólogos de Chs5 *in vivo*. Debido a la baja conservación de los fenotipos observados en el mutante del exómero de *S. cerevisiae* en otras levaduras (Anton et al., 2018; Hoya et al., 2017), decidimos analizar en el mutante *chs5Δ* de *S. cerevisiae* las características funcionales de los ortólogos de Chs5 de los ascomicetos *K. lactis* y *C. albicans*, el basidiomiceto *Ustilago maydis* y el zigomiceto *Mucor circinelloides*. Para ello, la mitad N-terminal de estas proteínas, región donde residen los dominios con las funciones esenciales de Chs5 de *S. cerevisiae* (Martín-García et al., 2011), pegadas a la GFP, fueron expresadas bajo el promotor regulable PGAL1. Solo la proteína de *K. lactis*, al igual que la de *S. cerevisiae*, fue capaz de revertir en el mutante *chs5Δ* todos los fenotipos analizados (resistencia a calcoflúor, y sensibilidad a litio, higromicina y rapamicina). Además, fue capaz de localizarse en el TGN (alta colocalización con el marcador de TGN/EE Sec7-mRuby2) y capaz de reclutar al TGN/EE al ChAP Chs6. La proteína de *C. albicans* revirtió tanto la sensibilidad al litio como a la higromicina. Esta proteína se reclutó perfectamente al TGN, pero a pesar de reclutar a Chs6 en puntos intracelulares, esta capacidad fue menor, requiriendo tiempos mayores de sobreexpresión (3 horas) que para la versión de *K. lactis*;

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

resultado en consonancia con la incapacidad para revertir la resistencia al calcoflúor. Las proteínas de especies externas al clado Ascomycota fueron capaces de conformar puntos intracelulares a tiempos largos de expresión, sin embargo no colocalizaban con el TGN/EE. Adicionalmente, la proteína de *U. maydis* presentaba cierta colocalización con el marcador de *cis*-Golgi Sed5-RFP. Además, ambas proteínas fueron capaces de reclutar a Chs6 hasta cierto punto. En cuanto al análisis de la complementación funcional, la proteína de *M. circinelloides* no pudo ser analizada ya que generaba toxicidad a tiempos largos de expresión. Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la de *U. maydis*, que además, revirtió la sensibilidad a litio. Estos datos señalan una conservación parcial de las funciones de los ortólogos de Chs5 fuera de Ascomycota, lo cual va en consonancia con la gran distancia evolutiva, pero, a su vez, señala la existencia de un exómero 'primitivo' que presentaría solo algunas características del exómero descrito en *S. cerevisiae*, el cual habría sufrido una gran especialización en el género *Saccharomyces* (Anton et al., 2018).

Sorprendentemente, la aparición de Chs5 y probable presencia del exómero coincide con aquellas especies que han perdido el complejo adaptador AP-4. En mamíferos, esta proteína media la localización polarizada de varias proteínas en la MP, una función similar a lo descrito para el exómero en levaduras. La redundancia funcional y la presión selectiva han terminado por decantarse a favor de la preservación del exómero en las especies de hongos.

The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi

Carlos Anton,* Javier Valdez Taubas,[†] and Cesar Roncero*¹

*Departamento de Microbiología y Genética, Instituto de Biología Funcional y Genómica, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, 37007, Spain and [†]Departamento de Química Biológica, Centro de Investigaciones en Química Biológica de Córdoba, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, X5000HUA Argentina

ORCID IDs: 0000-0002-7497-0080 (C.A.); 0000-0001-5964-3252 (C.R.)

ABSTRACT Yeast exomer is a heterotetrameric complex that is assembled at the *trans*-Golgi network, which is required for the delivery of a distinct set of proteins to the plasma membrane using ChAPs (Chs5-Arf1 binding proteins) Chs6 and Bch2 as dedicated cargo adaptors. However, our results show a significant functional divergence between them, suggesting an evolutionary specialization among the ChAPs. Moreover, the characterization of exomer mutants in several fungi indicates that exomer's function as a cargo adaptor is a late evolutionary acquisition associated with several gene duplications of the fungal ChAPs ancestor. Initial gene duplication led to the formation of the two ChAPs families, Chs6 and Bch1, in the Saccharomycotina group, which have remained functionally redundant based on the characterization of *Kluyveromyces lactis* mutants. The whole-genome duplication that occurred within the *Saccharomyces* genus facilitated a further divergence, which allowed Chs6/Bch2 and Bch1/Bud7 pairs to become specialized for specific cellular functions. We also show that the behavior of *S. cerevisiae* Chs3 as an exomer cargo is associated with the presence of specific cytosolic domains in this protein, which favor its interaction with exomer and AP-1 complexes. However, these domains are not conserved in the Chs3 proteins of other fungi, suggesting that they arose late in the evolution of fungi associated with the specialization of ChAPs as cargo adaptors.

KEYWORDS evolution; exomer; intracellular traffic; yeast

THE *trans*-Golgi network (TGN) constitutes a major sorting platform for the intracellular trafficking of proteins in all eukaryotic cells (Guo *et al.* 2014); therefore, it is not surprising that the molecular mechanisms involved in protein sorting at the TGN are evolutionarily conserved. However, despite this conservation, very little is known about the mechanisms that participate in this event.

Chitin synthesis in yeast was envisioned several years ago as a model for the study of the intracellular trafficking of proteins because the activity of the major chitin synthase depends on the efficient traffic of its catalytic subunit, Chs3, to the plasma membrane (PM) (Roncero 2002). In *Saccharomyces cerevisiae*,

the trafficking of Chs3 to the PM is blocked at the TGN/EE boundary in the absence of Chs5 (Santos and Snyder 1997) or Chs6 (Ziman *et al.* 1998) proteins. A further characterization of these proteins showed that both form the exomer together with three Chs6 paralogs, a complex that is required for the TGN to cell surface transport of Chs3 (Santos and Snyder 1997; Sanchatjate and Schekman 2006; Trautwein *et al.* 2006; Wang *et al.* 2006). Later on, it was demonstrated that the proteins Fus1 (Santos and Snyder 2003; Barfield *et al.* 2009) and Pin2 (Ritz *et al.* 2014) also depend on exomer for their delivery to the PM. Fus1 and Pin2 are proteins that contain a single transmembrane (TM) domain with very different functions; while Fus1 is required for cell fusion during mating (Trueheart *et al.* 1987), Pin2 is a prion-inducing protein (Ritz *et al.* 2014). Despite their different secondary structures and functions, these three proteins are fully retained at the TGN in the absence of exomer and have thus been described as *bona fide* exomer cargos. Accordingly, exomer is currently described as a specialized sorting platform at the TGN (Spang 2015).

Copyright © 2018 by the Genetics Society of America

doi: <https://doi.org/10.1534/genetics.118.300767>

Manuscript received November 6, 2017; accepted for publication January 31, 2018; published Early Online February 6, 2018.

Supplemental material is available online at <http://www.genetics.org/lookup/suppl/doi:10.1534/genetics.118.300767/-/DC1>.

¹Corresponding author: Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, Instituto de Biología Funcional y Genómica, C/Zacarías González, 37007 Salamanca, Spain. E-mail: crm@usal.es

Exomer is assembled at the TGN as a heterotetrameric complex formed by a dimer of Chs5 bound to two other molecules of either Bch1, Bud7, Chs6, or Bch2 (Paczkowski *et al.* 2012), all members of the ChAPs (Chs5-Arf1 binding proteins) family (Trautwein *et al.* 2006). This complex interacts directly with the Arf1 GTPase through both Chs5 and ChAPs components (see Supplemental Material, Figure S1 in File S1 for a model of exomer assembly). Based on sequence comparisons, ChAPs are separated into two groups: Bch1/Bud7 and Chs6/Bch2 (Trautwein *et al.* 2006). Bch1 has been shown to have a defined role in the recruitment of the GTPase Arf1 to the exomer and, consequently, influences the capacity of exomer to bend membranes *in vitro* (Paczkowski and Fromme 2014). Accordingly, Bch1 is also the most efficient ChAPs in the functional assemblage of exomer (Huranova *et al.* 2016). Bud7, which to date is poorly characterized, probably has redundant functions with Bch1 (Huranova *et al.* 2016). In contrast, Chs6 does not seem to have any critical role in the assembly of exomer but acts as a dedicated exomer cargo adaptor. Chs3 interacts with Chs6 through its C- and N-terminal cytosolic regions (Rockenbauch *et al.* 2012; Weiskoff and Fromme 2014), facilitating its sorting at the TGN. Hence, in the absence of Chs6, Chs3 is retained at the TGN. Interestingly, the concomitant absence of Bch1/Bud7 also blocks Chs3 at the TGN, which is most likely due to a general defect in the functioning of exomer (Paczkowski and Fromme 2014). The function of Bch2, the closest homolog to Chs6, is not understood, owing to the absence of distinct phenotypes for the single mutant *bch2Δ*. However, Bch2 is possibly the cargo adaptor of Pin2 (Ritz *et al.* 2014) and could also have a minor role in exomer assembly at the TGN (Huranova *et al.* 2016).

All of the *bona fide* cargos of exomer described so far share the additional characteristics of a polarized distribution and their arrival at the PM through an alternative route in the absence of any of the clathrin adaptor complexes AP-1, Gga1/2, or Ent3/5, which are known to regulate endocytic recycling (Valdivia *et al.* 2002; Copic *et al.* 2007; Barfield *et al.* 2009; Ritz *et al.* 2014). This poorly defined route allows the arrival of these cargos at the PM even in the absence of exomer. The mechanisms by which these cargos follow either route to the PM are not understood; however, it is known that a single mutation in the N-terminal domain of Chs3, L24A, triggers its transport via the alternative route by abolishing the physical interaction between Chs3 and the AP-1 complex (Starr *et al.* 2012). The role of Gga1/2 in this process is probably indirect, due to their early acting function, which recruits AP-1 for coat assembly at the TGN (Daboussi *et al.* 2012).

However, exomer mutants display several additional phenotypes (Trautwein *et al.* 2006) that cannot be linked to the defective transport of any of the exomer cargos described to date. Accordingly, our laboratory recently showed that the PM ATPase Ena1 relies on exomer for its polarized transport under several forms of stress, although this protein effectively reaches the PM in the *chs5Δ* mutant (Anton *et al.* 2017). This finding suggests a potential role for exomer in the trafficking of a

higher number of proteins that are not recognized as *bona fide* exomer cargos. Moreover, the absence of exomer also affects RIM101 signaling by altering the recruitment of the molecular machinery involved in the proteolytic processing of Rim101. These findings are consistent with exomer having a more general role in the organization of the TGN, which has been proposed following the characterization of exomer-deficient mutants in *Schizosaccharomyces pombe* (Hoya *et al.* 2017).

The basic rules governing intercellular trafficking are simple and relatively well conserved, but its complexity is enormous, providing specific solutions for the traffic between different organelles (Schlacht *et al.* 2014). Part of this complexity is achieved by the presence of multiple families of paralogous proteins that can act at discrete localizations or interact with different groups of cargos. Hence, the specificity of trafficking is in part encoded in the combinatorial interactions of these various players, including small GTPases and their regulators, cargo adaptors, and coat proteins. The functional relationship between exomer and several of the adaptor complexes described above, together with the evolutionary conservation of both complexes (Trautwein *et al.* 2006; Barlow *et al.* 2014) in fungi, provides an attractive framework for studying the potential coevolution between both complexes. Moreover, the evolutionary divergence of the ChAPs family provides the possibility of testing the potential specialization of exomer function along fungal evolution, while also addressing the ancient and conserved function of exomer.

Materials and Methods

Yeast strain construction

S. cerevisiae mutant strains were all made in the W303 background. *Kluyveromyces lactis* KHO69-8C, *Candida albicans* BWP17, and *Ustilago maydis* FB1 background strains were also used (Table 1). Specific transformation protocols were used for each species (see below).

***S. cerevisiae* constructions:** Yeast cells were transformed using the standard lithium acetate/polyethylene glycol procedure (Rose *et al.* 1990). Gene deletions were made using the gene replacement technique, with different deletion cassettes based on the *natMX4*, *kanMX4*, or *hphNT1* resistance genes (Goldstein and McCusker 1999). For the insertion of the *GAL1* promoter in front of the different ORFs, the cassette was amplified from pFA6a-*kanMX4*-p*GAL1* (Longtine *et al.* 1998). Proteins were tagged chromosomally at their C-terminus with GFP or mCherry, employing integrative cassettes amplified from pFA6a-GFP-*hphMx6*/pFA6a-GFP::*natMx4* or pFN21 (Sato *et al.* 2005). The *delitto perfetto* technique was performed to generate the gene truncations within the genome. In brief, this approach allows *in vivo* mutagenesis using two rounds of homologous recombination. The first step involves the insertion of a cassette containing two markers at or near the locus to be altered. The second one involves complete removal of the cassette and transfer of the expected genetic modification

Table 1 Yeast strains used

Strain	Genotype	Origin/reference
<i>S. cerevisiae</i>		
CRM67	W303, MATa, (<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>)	Laboratory collection
CRM2268	W303, MATa, <i>chs5Δ::natMx4</i>	Laboratory collection
CRM1590	W303, MATa, <i>chs3Δ::natMx4</i>	Laboratory collection
CRM1278	W303, MATa, <i>chs3Δ::URA3 chs5Δ::natMx4</i>	Laboratory collection
CRM2775	W303, MATa, <i>bch1Δ::kanMx4</i>	This study
CRM2778	W303, MATa, <i>bud7Δ::natMx4</i>	This study
CRM3068	W303, MATa, <i>chs6Δ::kanMx4</i>	This study
CRM3083	W303, MATa, <i>bch2Δ::natMx4</i>	This study
CRM3066	W303, MATa, <i>bch1Δ::kanMx4 bud7Δ::natMx4</i>	This study
CRM3081	W303, MATa, <i>chs6Δ::kanMx4 bch2Δ::natMx4</i>	This study
CRM2233	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1</i>	This study
CRM2244	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BUD7</i>	This study
CRM2379	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-CHS6</i>	This study
CRM2426	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH2</i>	This study
CRM1777	W303, MATa, <i>chs3Δ::URA3 aps1Δ::kanMx4</i>	Laboratory collection
CRM3089	W303, MATa, <i>bch1Δ::kanMx4 bud7Δ::natMx4 chs3Δ::hphNT1</i>	This study
CRM3091	W303, MATa, <i>chs6Δ::kanMx4 bch2Δ::natMx4 chs3Δ::hphNT1</i>	This study
CRM3155	W303, MATa, <i>aps1Δ::kanMx4</i>	Laboratory collection
CRM3157	W303, MATa, <i>chs5Δ::natMx4 aps1Δ::kanMx4</i>	Laboratory collection
CRM2406	W303, MATa, <i>PIN2-GFP::hphNT1</i>	Laboratory collection
CRM2507	W303, MATa, <i>chs5Δ::natMx4 PIN2-GFP::hphNT1</i>	Laboratory collection
CRM2474	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BUD7 PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2509	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH2 PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2511	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1 PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2512	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH6 PIN2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2287	W303, MATa, <i>bar1Δ::natMx4</i>	This study
CRM2461	W303, MATa, <i>bar1Δ::natMx4 chs5Δ:: hphNT1</i>	This study
CRM2288	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1 bar1Δ::natMx4</i>	This study
CRM2289	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BUD7 bar1Δ::natMx4</i>	This study
CRM1821	W303, MATa, <i>CHS6-mCherry::natMx4</i>	Laboratory collection
CRM2179	W303, MATa, <i>CHS5-mCherry::natMx4</i>	Laboratory collection
CRM2235	W303, MATa, <i>BCH2-GFP::hphNT1</i>	This study
CRM2637	W303, MATa, <i>BCH2Δ¹¹⁸-GFP::natMx4</i>	This study
CRM2639	W303, MATa, <i>BCH2Δ³¹-GFP::natMx4</i>	This study
CRM2584	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1-BCH2^{Frg1}</i>	This study
CRM2586	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1-BCH2^{Frg2}</i>	This study
CRM2588	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH1-BCH2^{Frg3}</i>	This study
CRM2641	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH2-GFP::natMx4</i>	This study
CRM2644	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH2Δ¹¹⁸-GFP::natMx4</i>	This study
CRM2647	W303, MATa, <i>kanMx6::PGAL1-BCH2Δ³¹-GFP::natMx4</i>	This study
<i>K. lactis</i>		
CRM2632	KHO69-8C, MATα, (<i>ura3 leu2 his3:loxP ku80:loxP</i>)	Heinisch <i>et al.</i> (2010)
CRM2823	KHO69-8C, MATα, <i>Klchs5Δ::URA3</i>	This study
CRM2666	KHO69-8C, MATα, <i>Klchs3Δ::LEU2</i>	This study
CRM2677	KHO69-8C, MATα, <i>Klbch1Δ::URA3</i>	This study
CRM2701	KHO69-8C, MATα, <i>Klchs6Δ::LEU2</i>	This study
CRM2712	KHO69-8C, MATα, <i>Klchs6Δ::LEU2 Klbch1Δ::URA3</i>	This study
<i>C. albicans</i>		
CAI4	<i>ura3::imm434/ura3::imm434</i>	Mio <i>et al.</i> (1996)
CRM693	CAI4, <i>chs3Δ::ura3Δ/chs3Δ::ura3Δ</i>	Sanz <i>et al.</i> (2005)
CRM743	CAI4, <i>chs3Δ/chs3Δ ura3Δ/ura3Δ</i>	Mio <i>et al.</i> (1996)
CRM2499	BWP17, (<i>ura3::imm434/ura3::imm434 his1::hisG/his1::hisG arg4::hisG/larg4::hisG</i>)	Enloe <i>et al.</i> (2000)
CRM2531	BWP17, <i>Cachs5Δ::ARG4/Cachs5Δ::HIS1</i>	This study
CRM2607	BWP17, <i>CHS3-GFP::SAT1</i>	This study
CRM2628	BWP17, <i>Cachs5Δ::ARG4/Cachs5Δ::HIS1 CHS3-GFP::SAT1</i>	This study
<i>U. maydis</i>		
CRM2442	FB1, <i>a1 b1</i>	Banuet and Herskowitz (1989)
CRM2443	FB1, <i>a1 b1, Umchs5Δ::hyg</i>	This study

to the chosen DNA locus. Specific protocols for this technique have been extensively described (Stuckey *et al.* 2011).

***K. lactis* constructions:** As in *S. cerevisiae*, gene deletions were made using the gene replacement technique; however, the DNA replacement cassette was highly concentrated (15×) (Rippert *et al.* 2017). In brief, cells (*his3:loxP ku80:loxP*, see Table 1) in log phase were made competent by resuspending them in a specific solution (1 M sorbitol, 1 mM bicine pH 8.35, and 3% ethylene glycol) and freezing the resuspension for at least 2 hr at -80° . Thawed cells were incubated for 5 min at 37° with 50 μ l of FISH DNA and ≈ 15 μ l of the target DNA. Then, a 40% polyethylene glycol 3300 solution was added and samples were incubated for 1 hr at 30° . Finally, the cells were washed and plated on selective growth media.

***C. albicans* constructions:** The replacement cassettes were made and concentrated in the same way as the *K. lactis* constructs. Yeast cells in log phase were transformed using a modified lithium acetate/electroporation protocol (Thompson *et al.* 1998).

***U. maydis* constructions:** Deletion mutants were generated using the *Golden Gate* procedure as described (Terfrüchte *et al.* 2014). In short, successive steps of cleavage, using the *BsaI* restriction enzyme, and DNA ligation with T4 ligase generated a plasmid with the gene replacement module flanked by homologous regions 500 bp in length. For the transformation, protoplasts were generated using the Novozym extract and frozen at -80° . Thawed cells were incubated with heparin and concentrated DNA, incubated with 40% polyethylene glycol 4000, and finally plated on selective growth media as already described (Tsukuda *et al.* 1988).

Plasmid construction

The plasmids used throughout this work are described in Table 2.

Chs3 hybrid proteins (Sc-Ca) were constructed by homologous recombination *in vivo* in *S. cerevisiae* using centromeric plasmids and were expressed under the control of the native promoter of *ScCHS3*.

The Chs3 hybrid protein that contains the C-terminal end of CaChs3 (Chs3^{CaCT}-GFP) was constructed in two steps. First, the plasmid pHV7-GFP(*NotI* Δ) was linearized with *NotI* restriction enzyme and treated with Klenow fragment, and then cotransformed into wild-type *S. cerevisiae* together with the C-terminal fragment of *CaCHS3* (see Figure S6 in File S1), which had been previously amplified using dual primers designed from the genome of the *C. albicans* BWP17 strain. Several URA⁺ colonies were selected and the plasmids were rescued in *Escherichia coli* DH5 α . After construct verification by sequencing, a GFP tag was added to the end of the hybrid protein by homologous recombination in the *Scchs3* Δ mutant, using the appropriate cassette amplified from the pFA6a-GFP-*hphMx6* plasmid.

The N-terminal hybrid protein (Ca^{NT}Chs3-GFP) was constructed using the plasmid pRS313-*CHS3*-GFP as a template.

The plasmid was linearized with *AgeI*, treated with Klenow, and cotransformed into wild-type *S. cerevisiae* together with the N-terminal fragment of *CaCHS3* (see Figure S6 in File S1). HIS⁺ colonies were then selected, and their corresponding plasmids were rescued using *E. coli* DH5 α and sequenced.

Media and growth assays

Yeast cells were grown at 28° in YEPD (1% Bacto yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) or in synthetic (SD) medium (2% glucose and 0.7% Difco yeast nitrogen base without amino acids) supplemented with the pertinent amino acids, and 2% agar in the case of solid mediums. For the *C. albicans* strains, YEPD was supplemented with 80 mg-liter⁻¹ uridine (YEPDU). In most cases, NaCl was added to a final concentration of between 0.7 and 1 M, LiCl between 0.01 and 0.2 M, NH₄Cl between 0.1 and 0.2 M, hygromycin between 40 and 100 μ g \cdot ml⁻¹, rapamycin between 2 and 20 nM, and calcofluor white (CW) between 0.01 and 0.1 mg \cdot ml⁻¹. CW sensitivity was always tested on SD medium buffered with 50 mM potassium phthalate at pH 6.2 as described (Trilla *et al.* 1999). For some experiments, yeast extract, glucose, and supplements (YES) (0.5% Bacto yeast extract, 3% glucose, and 50 mg/liter each of adenine, L-histidine, L-leucine, L-lysine, and uracil) media was also used.

C. albicans filamentation was induced from stationary cultures as follows: cells from 200 μ l of a stationary culture, grown in YEPDU for at least 20 hr at 28° ($OD_{600} > 20$), were recovered by centrifugation and resuspended in 5 ml of prewarmed filamentation media (YEPDU with 10% fetal bovine serum). This culture was incubated at 37° with agitation for 1–3 hr before the images were taken (Calderón-Noreña *et al.* 2015).

Drop tests

To assess the growth phenotypes, cells of each tested strain from fresh cultures were resuspended in water and adjusted to an OD_{600} of 1.0. Ten-fold serial dilutions were prepared, and drops were spotted onto the appropriate agar plates containing media supplemented as indicated. Plates were incubated at 28° for 2–5 days.

Gradient plates were prepared by successively pouring two layers of media with different compositions. The first layer (containing the tested compound) was poured into a moderately inclined square Petri dish. After solidification, the plate was placed into a flat position and the second layer (with the same composition, only without the inhibitory compounds) was poured on top (Maresova and Sychrova 2005). In these experiments, the same diluted culture (OD_{600} 0.1) was spotted along the plate.

Genetic screening

Wild-type yeast cells (BY4741, *MATa his3 Δ 1 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0*) were transformed using the LiAc method with 500 ng of a yEP52 genomic plasmid library (Carlson and Botstein 1982). Approximately 30,000 transformants were plated on YPD medium containing 75 μ g/ml CW. The colonies that grew on this media were retested for CW resistance

Table 2 Plasmids used

Plasmid	Genotype	Origin/reference
CRM264	pRS315	Laboratory collection
CRM264	pRS316	Laboratory collection
CRM254	pHV7::CHS3-GFP(<i>NotI</i> Δ)	Laboratory collection
CRM1131	pRS315::CHS3-GFP	Sacristan <i>et al.</i> (2013)
CRM1253	pRS313::CHS3-GFP	Sacristan <i>et al.</i> (2013)
CRM1929	pRCW3 (yEP52::BCH2::LEU2)	This study
CRM1934	pJV30 (PTPI-BCH2::LEU2)	This study
CRM1205	pRS316::FUS1-GFP	Santos and Snyder (2003)
CRM2670	pHV7::CHS3 ^{CaCT} -GFP::hphNT1	This study
CRM2650	pRS313::CaNTCHS3-GFP	This study
CRM2546	pAG25 (<i>natMx4</i>)	Goldstein and McCusker (1999)
CRM1188	pUG6 (<i>kanMx4</i>)	Goldstein and McCusker (1999)
CRM1451	pFA6a-hphNT1	Goldstein and McCusker (1999)
CRM2037	pFA6a- <i>kanMx6</i> -PGAL1	Longtine <i>et al.</i> (1998)
CRM1995	pFA6a-GFP-hphNT1	Sato <i>et al.</i> (2005)
CRM1811	pFA6a-GFP- <i>natMx4</i>	Sato <i>et al.</i> (2005)
CRM2653	pFN21 (<i>mCherry-natMx4</i>)	Sato <i>et al.</i> (2005)
CRM2360	pGSHU (CORE Delitto Perfetto)	Stuckey <i>et al.</i> (2011)
CRM2620	pJH955L (LEU2)	Heinisch <i>et al.</i> (2010)
CRM2621	pJH955U (URA3)	Heinisch <i>et al.</i> (2010)
CRM3236	pFA-CaHIS1	Gola <i>et al.</i> (2003)
CRM3238	pFA-CaARG4	Gola <i>et al.</i> (2003)
CRM2583	pFA-GFP-SAT1	Schaub <i>et al.</i> (2006)

and later expanded, and the plasmids were isolated and sequenced.

Fluorescence microscopy

Yeast cells expressing GFP/mCherry-tagged proteins were grown to early logarithmic phase in SD medium supplemented with 0.2% adenine. Living cells were visualized directly by fluorescence microscopy. Filamentation of *C. albicans* was performed on YEPDU media, where the cells were washed once with SD medium before being visualized.

CW staining

Two different protocols were used throughout the work as described (Arcones and Roncero 2016). For vital staining, CW was directly added to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of the fresh cells growing on rich media, and then cultures were incubated at 28° for 1 hr. For staining of fixed cells, 1 ml of logarithmic culture was centrifuged, and cells were resuspended in 200 μl of 3.2% formaldehyde and incubated at 4° for 30 min. Then, aliquots were washed twice with PBS and incubated for 5 min with 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ CW. For hyphal staining, fixed filaments were previously separated by incubation with proteinase K at 34° for 30 min and later stained as indicated.

Microscopic images were obtained using a Nikon 90i epifluorescence microscope ($\times 100$ objective; NA: 1.45) (Nikon, Garden City, NY), equipped with a Hamamatsu ORCA ER digital camera. Tagged proteins were visualized using a 49002 ET-GFP (FITC/Cy2) filter for GFP and a 49005 ET-DsRed (TRITC/Cy3) filter for mCherry. A 49000 ET-DAPI filter was used for CW staining (Chroma Technology). The images were then processed using ImageJ software (National Institutes of Health) and mounted with Adobe Photoshop

CS5 (San José, CA) software. All images shown in each series were acquired under identical conditions and processed in parallel to preserve the relative intensities of fluorescence for comparative purposes. In all figures, the white bar represents 5 μm .

When necessary, image measurements obtained with ImageJ were statistically analyzed using the Student's *t*-test for unpaired data. Analyses were performed using GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) software. Significantly different values ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.001$) are indicated (*, **, and ***).

Protein extracts and immunoblotting

Total cell lysates were prepared by resuspending cells from 30 ml logarithmic phase cultures in 150 μl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 0.1% Triton, and 150 mM NaCl) containing 1 \times protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ leupeptin, and pepstatin A 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Cells were disrupted using glass beads (0.45 mm; Sigma [Sigma Chemical], St. Louis, MO) during three pulses of 15 sec each with an intensity of 5.5 units in a Fast prep cell disrupter (FP120, BIO101). Cell debris was eliminated by centrifugation (5 min, 10,000 $\times g$ at 4°) and the resultant supernatant was boiled for 5 min with 4 \times sample buffer (0.2 M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 40% glycerol, and 4% β -mercaptoethanol). Next, 100 μg of protein per sample were separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Trilla *et al.* 1999). The membranes were then blocked with skimmed milk and incubated with the corresponding antibodies: anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (Living colors, Clontech) and anti-tubulin (T5162; Sigma). Blots were developed using an ECL kit (Advansta).

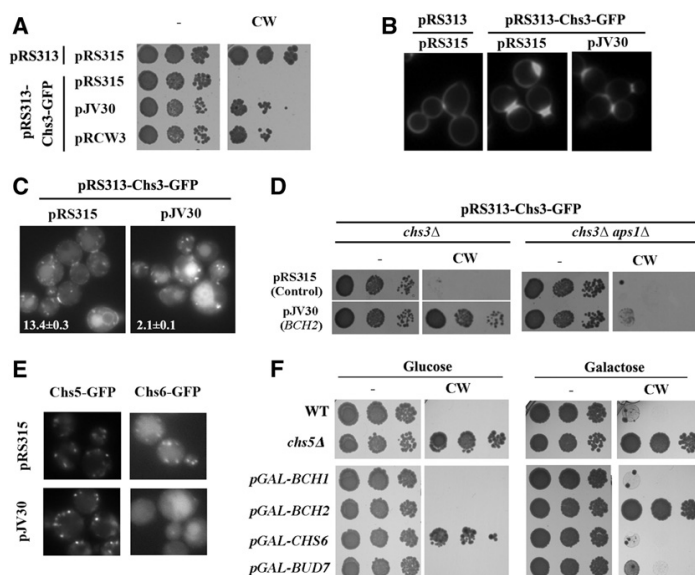


Figure 1 Phenotypes of *BCH2* overexpression. (A) Calcofluor white (CW) resistance promoted by multicopy plasmids pRCW3 and pJV30, both containing *BCH2*. (B) CW vital staining of the indicated strains. Note the reduction of fluorescence after *BCH2* overexpression. (C) Localization of Chs3-GFP in *chs3Δ* strains transformed with the indicated plasmids. Numbers indicate the percentage of cells showing localization at the neck ($n > 100$). (D) CW resistance of the indicated mutants transformed with control or pJV30 plasmids. Note the sensitization to CW in the *aps1Δ* mutant after *BCH2* overexpression. These experiments were always performed in strain CRM1590 (*chs3Δ::natMx4*) transformed with plasmids pRS315 or pRS315-Chs3-GFP as indicated. (E) Localization of Chs5-mCh and Chs6-mCh after *BCH2* overexpression (pJV30). Chs5-mCh and Chs6-mCh are tagged on the chromosome. (F) CW resistance after overexpression of the different ChAPs. Experiment was carried out in wild-type (WT) cells in which the *pGAL* promoter was inserted at the chromosome replacing the endogenous promoter of each ChAP. Overexpression of the different ChAPs was achieved by growth in galactose-supplemented media. Note that cells grown in glucose should behave similarly to null mutants of the corresponding genes. Also see Figure S2 in File S1 for a more complete set of experiments.

Data availability

All the strains and plasmids used throughout the work are described in Table 1 and Table 2, and are available upon request.

Results

Bch2 is a ChAP with distinct characteristics

Chs3 depends on complex molecular machinery for its delivery to the PM (Roncero 2002). In addition, Chs3 has been shown to contain several post-translational modifications that affect its intracellular transport. These include palmitoylation (Lam *et al.* 2006), N-glycosylation (Sacristan *et al.* 2013), and ubiquitination (Arcones *et al.* 2016). Therefore, we aimed to identify yeast proteins that, when overproduced, would alter the intracellular transport of Chs3 leading to CW resistance due to the reduction of Chs3 levels at the PM. Consequently, we performed a screen for yeast genes that, when overexpressed in the yEP52 plasmid, would confer CW resistance. Among the plasmids isolated in this screen, the plasmid RCW3 contained the *BCH2* gene previously linked to the function of Chs3 (Trautwein *et al.* 2006) and was used to carry out the work presented here.

BCH2 was subcloned into plasmid pJV30 under the control of the strong triose phosphate isomerase (*TPI*) promoter, a construct that also promoted CW resistance (Figure 1A). Moreover, overexpression of *BCH2* using the plasmid pJV30 resulted in a strong reduction in fluorescence after CW staining (Figure 1B), consistent with a reduction in chitin synthesis in these cells. This result was compatible with our original hypothesis that the overexpression of some proteins could affect Chs3 trafficking; therefore, the intracellular localization of Chs3-GFP after *BCH2* overexpression was addressed. It was found that Chs3-GFP was mostly localized at intracellular

spots resembling the TGN in cells containing the pJV30 plasmid (Figure 1C). Moreover, localization of Chs3-GFP at the neck was severely impaired, which explained resistance to CW and the lower fluorescence staining observed in these strains. The absence of Chs3 at the ER after *BCH2* overexpression discounted the idea of any role of Bch2 in the exit of Chs3 from the ER, suggesting that Chs3 might be retained at the TGN. Interestingly, Bch2 is a member of the exomer, a complex that is involved in the exit of Chs3 from the TGN (Trautwein *et al.* 2006). In the absence of a functional exomer, its cargos are retained in the TGN and their delivery to the PM is rescued by deletion of the clathrin adaptor complex AP-1; therefore, the effects of *BCH2* overexpression in the *aps1Δ* mutant were addressed. As shown in Figure 1D, deletion of AP-1 alleviated the effects of *BCH2* overexpression, restoring CW sensitivity. Together, these results are consistent with a defect in exomer function with respect to Chs3 traffic after *BCH2* overexpression. To test whether this defect was due to a general failure of exomer assembly or one that specifically affected Chs3 transport, the localization of Chs5 and Chs6 proteins was monitored. The dotted Chs5 localization was not affected by pJV30, but Chs6, the ChAP protein acting as the dedicated cargo adaptor for Chs3, was not assembled into the exomer, as can be seen by its diffuse cytoplasmic localization upon *BCH2* overexpression. Moreover, the high level of Bch2 did not affect the intracellular localization of the other exomer cargos Fus1 and Pin2 (see Figure S2 in File S1 and Table 3). Apparently, high levels of Bch2 specifically displaced the dedicated cargo adaptor for Chs3 from the exomer complex.

Then, we addressed whether overexpression of other ChAPs would have similar effects by expressing individual ChAPs from the strong inducible *GAL1* promoter. In glucose media, only the absence of *CHS6* led to CW resistance, the

same result as reported for the *chs6Δ* mutant (Trautwein *et al.* 2006). In galactose, overexpression of *BCH2*, but not of any of the other ChAPs, promoted CW resistance (Figure 1F). In addition, none of the overexpressed ChAPs produced sensitivity to lithium, another classical phenotype associated with the absence of exomer (Ritz *et al.* 2014) (see Figure S2 in File S1 and Table 3). However, overexpression of *BCH2* also caused partial sensitivity to ammonium that may be associated with the reduced functioning of the Bud7/Bch1 proteins.

Altogether, these results indicate that the deleterious effects of ChAPs overexpression are specific for *BCH2* and directly linked to *Chs6* function, probably due to the similarity between these proteins (Trautwein *et al.* 2006). Interestingly, *Bch2* contains a unique C-terminal region (see Figure S3A in File S1) that makes it longer than any of the other ChAPs. This region includes a potential SH3 interaction domain (Tonikian *et al.* 2009). To assess the potential function of the C-terminal region, the most C-terminal 31 amino acids were deleted. Wild-type *Bch2*-GFP typically localizes at the TGN but, after overexpression, *Bch2*-GFP also appeared extensively associated with cellular membranes (Figure S3, B and C in File S1). However, while *Bch2*^{Δ31}-GFP localized at the TGN, similar to the wild-type protein, its overexpression did not lead to it being accumulated on internal membranes to the same extent (Figure S3, B and C in File S1). The primary TGN localization signal appeared to be upstream of the unique C-terminal region, because a larger deletion in the C-terminal region of *Bch2* (Δ118) completely altered the TGN localization of the protein. More importantly, unlike overexpression of *Bch2*-GFP, overexpression of *Bch2*^{Δ31}-GFP did not produce CW resistance, indicating that the effects of *BCH2* overexpression on *Chs3* transport are associated with its unique C-terminal region (Figure S3D in File S1). However, this region is not the only reason for the CW resistance phenotype, as transplanting the C-terminal region of *Bch2* onto *Bch1* did not promote CW resistance upon overexpression (Figure S3E in File S1).

The evolutionary story of the ChAPs family

Our results clearly indicated that *Bch2* behaved differently from other members of the ChAPs family. Therefore, we addressed the evolutionary divergence among the different ChAPs, taking into consideration that exomer is a complex that is conserved across the fungi kingdom. While the exomer scaffold *Chs5* is well conserved across fungi (Roncero *et al.* 2016), the ChAPs are not, since most fungi contain a unique ChAP. Moreover, duplication of ChAPs occurred later on in their evolution because more than one ChAPs can only be found within the Saccharomycotina group (Figure 2A, see also Figure S4 in File S1). A direct comparison of ChAPs sequences (Figure 2B) indicated that the oldest ChAP, *Bch1*, was relatively well conserved, and the dendrogram identified three separated clades that resembled the evolutionary history of the Saccharomycotina group. When *Bch1* sequences from different fungi (Figure 2B) were compared, early branching

Table 3 Effects of altering exomer configuration by deleting or overexpressing different ChAPs

Strain	Growth ^a					Cargo localization ^b		
	CW	LiCl	NaCl	Hyg	NH ₄ Cl	Chs3	Fus1	Pin2
WT	—	++	++	++	++	+	+	+
<i>chs5Δ</i>	+++	—	—	—	—	—	—	—
<i>chs6Δ</i>	+++	++	++ ^c	NT	++	—	+	+
<i>bch2Δ</i>	—	++	++ ^c	NT	++	+	+	+
<i>bch1Δ</i>	—	++	NT	NT	++	+	+	+
<i>bud7Δ</i>	—	++	NT	NT	++	+	+	+
<i>chs6Δ bch2Δ</i>	+++	—	+	++	++	—	+	+
<i>bch1Δ bud7Δ</i>	+++	++	+	—	±	—	—	—
<i>pGAL-BCH1^{OE}</i>	—	++	++	++	++	+	+	+
<i>pGAL-BCH2^{OE}</i>	+++	++	++	++	+	—	+	+
<i>pGAL-BUD7^{OE}</i>	—	++	++	++	++	+	+	±
<i>pGAL-CHS6^{OE}</i>	—	++	++	++	++	+	+	+

WT, wild-type; NT, not tested.

^a Growth was assessed on YEP plates, using glucose or galactose (OE) as carbon sources and defined as being from maximum (++++) to minimum (—). Also see Figure S2 in File S1 for the real results after serial dilutions of the different strains.

^b Localization was assessed microscopically using the tagged versions of the exomer cargos *Chs3*-GFP, *Fus1*-GFP, and *Pin2*-GFP expressed from their own promoters from centromeric plasmids or the chromosome, as indicated in *Materials and Methods*. (+) indicates normal arrival of the cargo at the PM, while (—) indicates retention at the *trans*-Golgi network.

^c Data collected from previous reports (Trautwein *et al.* 2006; Ritz *et al.* 2014).

genera, such as *Yarrowia*, (Figure 2, A and B) appeared preferentially associated with fungi from the other major groups rather than with other members from the Saccharomycotina. This *Bch1* comparison clearly separated the CTG clade (species that translate CTG codon as serine) (Wang *et al.* 2009) within the Saccharomycotina group. Both CTG and non-CTG-containing genera contained two ChAPs, but the direct comparison of the second ChAP, *Chs6*, clearly differentiated the two. Also, the CTG members that were outside the main branches of the tree had very divergent versions of *Chs6* (Figure 2B), with some intermediate representatives like *Wickerhamomyces anomalus*. Somehow these differences effectively recapitulate the evolutionary history reported within the Saccharomycotina group (Figure 2A). Later on, the whole-genome duplication (WGD) associated with the WGD clade (*Saccharomyces* genus) led to the appearance of the four ChAPs that have been previously identified and characterized in *S. cerevisiae*.

Addressing exomer function across fungi

Considering the evolutionary divergence of the ChAPs family, additional studies were conducted to investigate the most primitive function of exomer by deleting *CHS5*, the core component of exomer in several fungi. The basidiomycete *U. maydis* and the CTG representative *C. albicans* were chosen because chitin synthesis has been studied in some detail in both organisms (Weber *et al.* 2006; Lenardon *et al.* 2010b). In addition, *K. lactis* was used as a close relative of *S. cerevisiae* without genome duplication. Deletions were performed as described for each organism (see *Materials and Methods* section for details), and CW resistance was addressed using the corresponding *chs3Δ* mutant as a control. As shown in Figure 3A, deletion of *CHS5* only conferred resistance to CW

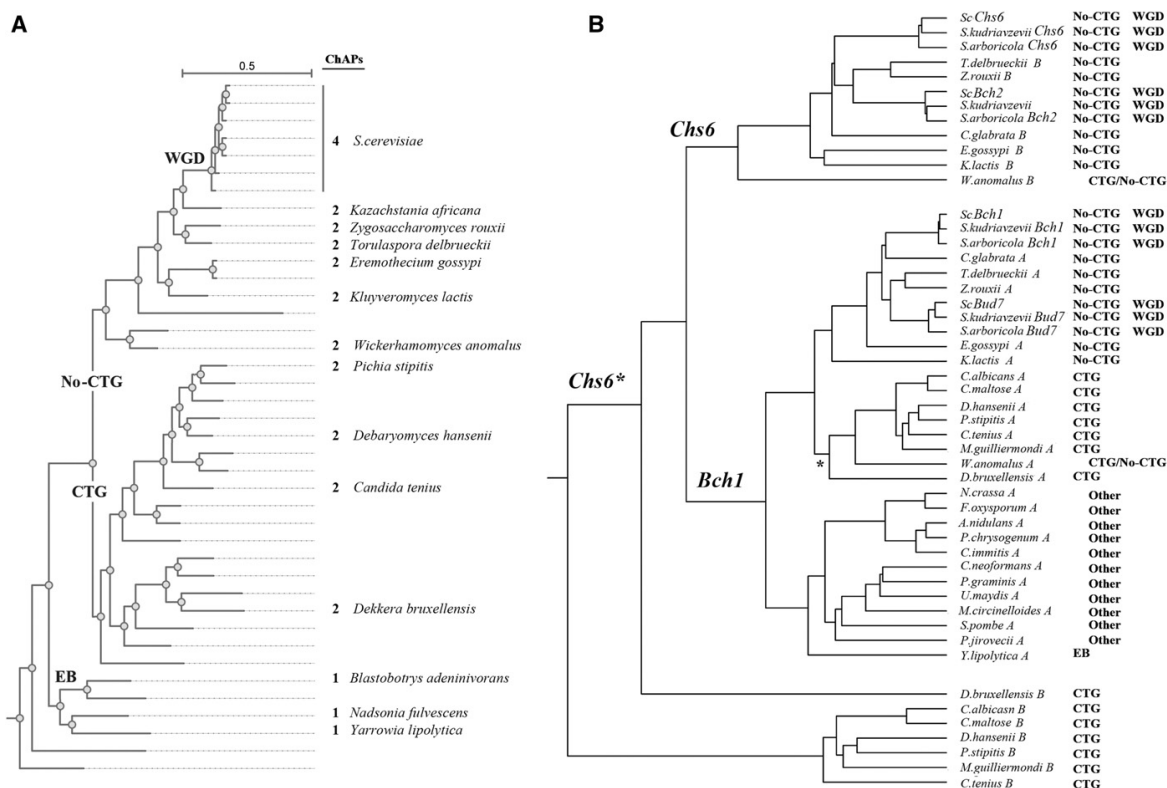


Figure 2 Phylogeny of ChAPs (Chs5-Arf1 binding proteins) along fungi. (A) Phylogenetic tree of the Saccharomycotina clade. Major evolutionary lineages are indicated, including the proposed EB groups. Tree images were obtained from MycoCosm portal (Grigoriev *et al.* 2014). The number of ChAPs members identified in each group is indicated on the right. Note the presence of a single ChAP in all early branched genera, which is similar to other major groups of fungi (see also Figure S4 in File S1). (B) A phylogenetic analysis of the ChAPs family. Individual proteins were identified by BLAST analysis and a multiple alignment with CLUSTALW was later performed. Analysis is represented as a rooted phylogenetic tree (UPGMA) with branch lengths. Only the genes within the genus *Saccharomyces* have been named, and the letters A and B have been used to indicate the homologous closest to ScBch1 and ScChs6, respectively. See text for a more detailed description of the tree. BLAST, basic local alignment search tool; CTG, species that translate CTG codon as serine; EB, early branched; WGD, whole-genome duplication.

in *S. cerevisiae*. This result is consistent with the absence of caspofungin sensitivity outside *S. cerevisiae* considering that both phenotypes have been previously linked to defective chitin synthesis (Markovich *et al.* 2004). Next, chitin was visualized directly using CW staining after cell fixation (Figure 3B). Chitin rings similar to those of wild-type were neatly visible in *Klchs5Δ* and *Cachs5Δ* strains at the neck region, but not in the corresponding *chs3Δ* controls. Likewise, *U. maydis chs5Δ* cells also showed apparent normal CW staining. Surprisingly, the best-studied role of exomer in *S. cerevisiae*, namely controlling Chs3 PM localization and hence chitin synthesis, is not conserved in *U. maydis*, *C. albicans*, or even *K. lactis*.

S. cerevisiae exomer mutants display additional phenotypes like sensitivity to cationic compounds or rapamycin (Parsons *et al.* 2004). Therefore, these exomer mutant phenotypes were also tested in these other fungi (Figure 3C). As a result, no phenotypes were found for *U. maydis* or *C. albicans chs5Δ* mutants, except for a slight sensitivity to rapamycin. However, the *K. lactis chs5Δ* mutant was sensitive to lithium and

hygromycin, the same as *S. cerevisiae* (see also Figure 4A). However, in contrast to *Scchs5Δ*, *Klchs5Δ* was resistant to high concentrations of NaCl.

In summary, most of the phenotypes associated with the absence of exomer in *S. cerevisiae*, including reduced chitin synthesis or sensitivity to NaCl, were not observed in other fungi, and only sensitivity to LiCl was observed in *K. lactis*, a close relative of *S. cerevisiae*. Taken together, our data indicate that at least some of the exomer functions reported to date were most probably acquired in correlation with the expansion of the ChAPs family.

ChAPs have maintained redundant functions in *K. lactis*, but have acquired divergent functions in *S. cerevisiae*

If the previous statement is true, then what is the conserved function of exomer? To answer this question, the phenotypes exhibited by the different exomer mutants of *K. lactis* and *S. cerevisiae* were studied. In *S. cerevisiae*, individual ChAPs mutants other than *chs6Δ* had no clear phenotypes (Table 3),

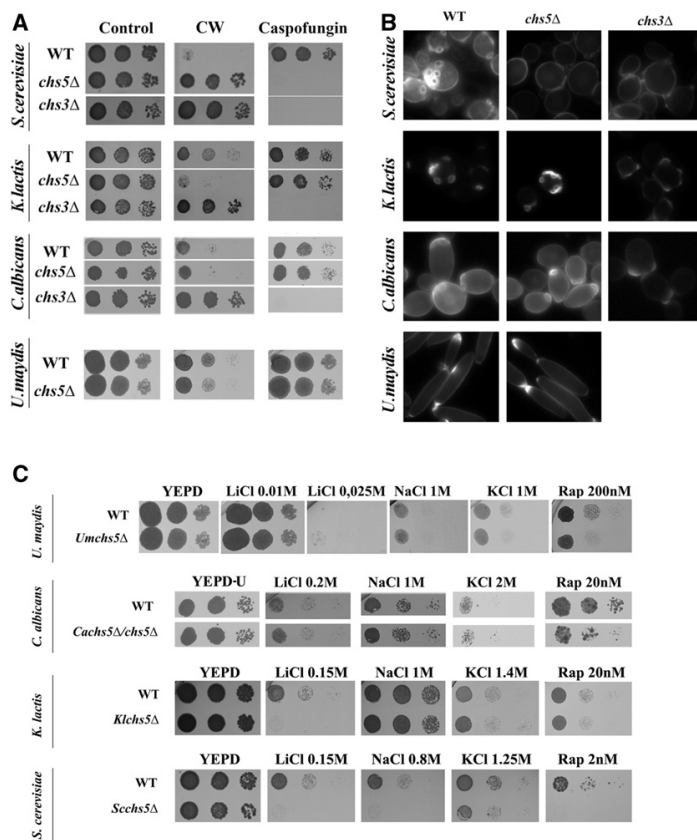


Figure 3 Characterization of exomer mutants in different fungi. (A) Sensitivity of the *chs5Δ* mutants of different fungi to calcofluor white (CW) and caspofungin, as compared to the corresponding wild-type (WT) and *chs3Δ* mutants used as controls. *chs3Δ* mutants were resistant to CW and sensitive to caspofungin in all organisms, but only the *S. cerevisiae chs5Δ* exomer mutant reproduced this phenotype. (B) CW staining of fixed cells on the indicated strains and organisms. Note the absence of chitin rings in all the *chs3Δ* mutants, which did not occur in the *chs5Δ* mutant, except in *S. cerevisiae*. *U. maydis chs5Δ* mutant showed normal CW vital staining. (C) Extended characterization of phenotypes of the different mutants. Cells were grown to early logarithmic phase, serially diluted, and plated on the indicated media. Growth was scored after 2–3 days of growth at 28°.

owing to genetic redundancy between the homologous protein pairs Bud7/Bch1 and Chs6/Bch2. Only the simultaneous deletion of both *CHS6* and *BCH2* genes produced lithium sensitivity in *S. cerevisiae*, which turned out to be identical to that of the *chs5Δ* mutant (Figure 4A). In contrast, the *bch1Δ bud7Δ* double mutant was sensitive to hygromycin like the *chs5Δ* mutant, but the mutant *chs6Δ bch2Δ* was not (Figure 4A). All together, these results indicate that the *S. cerevisiae* ChAPs pairs have distinct and nonredundant roles regarding their function on exomer. In *K. lactis*, the individual ChAPs mutants exhibited no distinctive phenotypes, since both *Klbch1Δ* and *Klchs6Δ* mutants were resistant to lithium and hygromycin, similar to wild-type (Figure 4B). Furthermore, only deletion of both ChAPs (*Klbch1Δ chs6Δ* mutant) fully reproduced the phenotypes associated with the absence of exomer (*Klchs5Δ*), a clear indication of the functional redundancy between both ChAPs.

Next, the sensitivity of *S. cerevisiae* exomer mutants to a high concentration of NH_4^+ in both defined (not shown) and rich media (Figure 4C, see also Figure S2 in File S1) was analyzed. This sensitivity could be distinctively linked to the function of Bch1/Bud7, since the *chs6Δ bch2Δ* mutant grew in a similar way as the control. The *K. lactis chs5Δ* mutant was not sensitive to a high concentration of ammonium; however, the mutant

showed reduced growth on YES media (Figure 4C). YES is a complex media capable of supporting the growth of *S. cerevisiae* using yeast extract and a limited supply of amino acids (histidine, leucine, and lysine; see *Materials and Methods* for further details on the media composition) as the nitrogen source. Figure 4C shows that *Klchs5Δ*, as well as *Klbch1Δ* and *Klbch1Δ chs6Δ*, were not able to grow on YES media, but that NH_4^+ restored the full growth of all of these strains. Moreover, amino acids like Asp or Glu, which are used as the preferred nitrogen source in yeast, also improved the growth of the *Klbch1Δ* ChAP mutant, although this was not the case of the *Klchs5Δ* mutant lacking a functional exomer. Other amino acids did not have an effect on the growth of any of the strains tested. Interestingly, the *Klchs6Δ* mutant grew normally on YES media but, in the absence of Bch1, the presence of a functional Chs6 was required for the use of Asp or Glu as a nitrogen source, since these amino acids were not able to improve the growth of the double *Klbch1Δ chs6Δ* mutant. These results indicate that the *K. lactis* exomer mutants have a significant defect in the utilization of amino acids as a source of nitrogen, which requires the presence of at least one functional ChAP. This result reinforces the idea that both ChAPs are functionally redundant in this organism, although the role of Bch1 in this process seems to be more important.

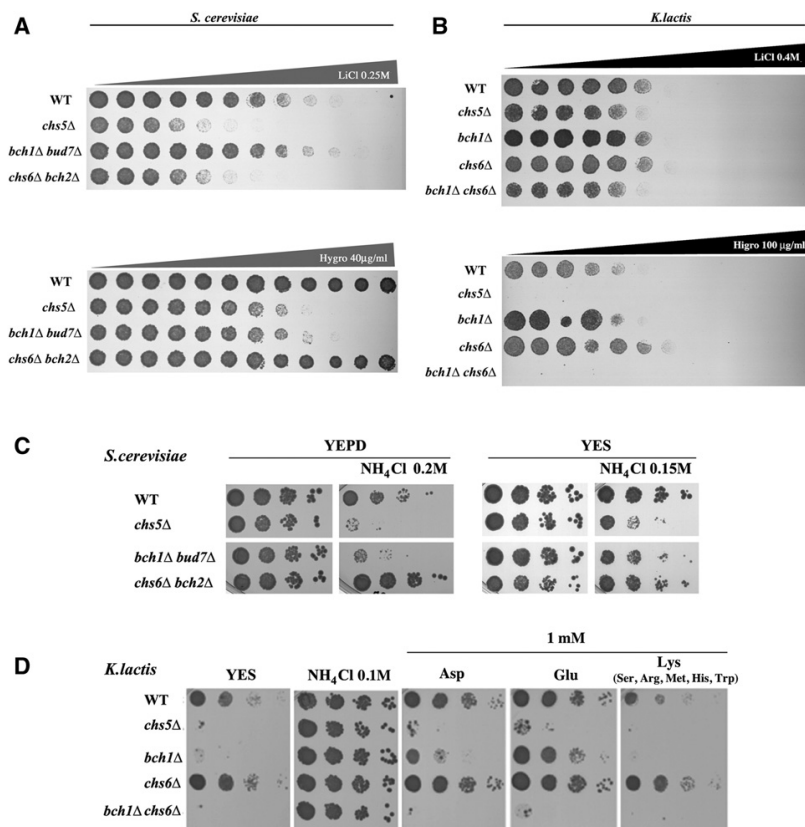


Figure 4 Phenotypic characterization of exomer mutants in *S. cerevisiae* and *K. lactis*. Growth of the indicated *S. cerevisiae* (A) and *K. lactis* (B) mutants on YEPD gradient plates containing increasing concentrations of different compounds. Logarithmic cultures were diluted OD₆₀₀ 0.1 and spotted at identical concentrations along the gradient plate. (C) Growth of the indicated *S. cerevisiae* strains on complex media supplemented with NH₄Cl. (D) Growth of the indicated *K. lactis* mutants on YES media supplemented with the indicated nitrogen sources. Panel on the right represents the plate supplemented with Lys, where the results with either amino acid were identical. (C and D) show early logarithmic phase cultures grown on YEPD that were serially diluted and spotted onto the different plates. Note the specific sensitivity of *S. cerevisiae* exomer mutants to high concentrations of NH₄Cl, which is not observed in the corresponding mutant in *K. lactis*. The individual ChAPs mutants of *S. cerevisiae* did not show sensitivity toward any of the compounds used in this figure (see Figure S2B in File S1), therefore only the double ChAPs mutants were tested. *K. lactis* contains only two ChAPs, therefore the results for the individual mutants are presented. Note that in *S. cerevisiae* always one of the double mutants behaved exactly as the null exomer mutant *chs5Δ*, while in *K. lactis* the individual mutants lacked phenotype and only the absence of the two ChAPs showed a phenotype equivalent to the null *chs5Δ* mutant. YEPD, 1% Bacto yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose; YES, yeast extract, glucose, and supplements; WT, wild-type.

Exomer regulates chitin synthesis localization in *C. albicans*

Chitin synthesis in *C. albicans* is well documented and is mainly dependent on the delivery of CaChs3 to the PM (Sanz *et al.* 2005; Lenardon *et al.* 2010a). Previously, it was said that the amount of chitin seemed similar in the *chs5Δ* and wild-type strains of *C. albicans* after CW staining and, accordingly, the *Cachs5Δ* mutants did not show significant changes in their sensitivity to CW or caspofungin (Figure 3). However, upon CW vital staining, it was observed that fluorescence was partially delocalized in the *C. albicans chs5Δ* mutant, which showed lateral staining in most buds in addition to the normal staining at the neck (Figure 5A). Moreover, in the wild-type strains, chitin was uniformly distributed during hyphal elongation except at the tip of the hypha. This distribution was similar to that observed in the *chs5Δ* mutant, although a longer portion of the tip remained consistently devoid of fluorescence in the mutant (Figure 5A, see also Figure S5 in File S1), suggesting a partial delocalization of chitin. This defect did not significantly affect *C. albicans* morphogenesis since cell filamentation occurred normally in the exomer mutants under all the conditions tested (Figure S5 in File S1 and data not shown). To understand this

phenotype, CaChs3 localization was determined by tagging the endogenous *CaCHS3* gene with GFP (Sacristan *et al.* 2012). In the wild-type strain, CaChs3-GFP appeared mostly localized at the neck of yeast cells and also showed a partial distribution along the membrane of the small buds (Figure 5, B and C). The *Cachs5Δ* mutant showed a similar accumulation of CaChs3-GFP at the neck, but fluorescence seemed to be strongly reduced in the bud membranes (Figure 5, B and C). Moreover, the intracellular spots observed for Chs3 were significantly more intense than in the wild-type. Similar results were observed during hyphal growth, where CaChs3 was fully polarized in the tips of wild-type cells with a neat gradient extending from the tip. This polarization seemed reduced in the *Cachs5Δ* mutant, showing a more uniform distribution of the protein along the tip (Figure 5B and Figure S5B in File S1), which was associated with a higher accumulation of the protein at intracellular spots. Altogether, these results indicate that CaChs3 efficiently reaches the PM in the absence of exomer. However, exomer could have a role in the polarized delivery of CaChs3 from the TGN, a finding that is similar to what has been recently observed for the *Ena1* protein of *S. cerevisiae* (Anton *et al.* 2017).

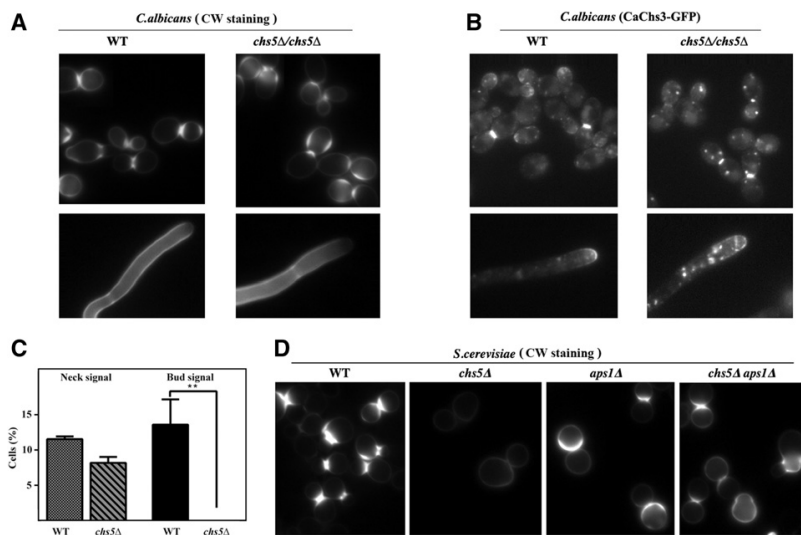


Figure 5 Characterization of chitin synthesis in *C. albicans*. (A) CW vital staining of *C. albicans* yeast cells strains as indicated (upper panels). Staining was performed for 60 min. For hyphal visualization (lower panels), filamentation was induced for 2 hr and staining was performed on fixed cells as described in the *Materials and Methods* section. Note the different localization of chitin in the mutant in both yeast and hyphal cells. (B) Intracellular localization of CaChs3-GFP on yeast and hyphal cultures. (C) Panel represents numerical analysis of CaChs3-GFP localization in yeast ($n = 3$, >100 cells counted in each experiment). Note the apparent loss of signal for CaChs3-GFP in the buds of the exomer mutant. (D) CW vital staining of the indicated mutants of *S. cerevisiae*. Note the partial delocalization of chitin to the bud in the *aps1Δ* mutants, a result similar to that observed in the *CaChs5Δ* mutant (A). See Figure S5 in File S1 for additional data on chitin and CaChs3-GFP localization. CW, calcofluor white; WT, wild-type.

A similar situation has been previously described in *S. cerevisiae*, where the absence of the AP-1 complex resulted in partially delocalized chitin deposition (Figure 5D). Moreover, a double mutant (*chs5Δ aps1Δ*) lacking exomer and AP-1 complexes regained chitin synthesis and CW sensitivity as compared to the single exomer mutant (*chs5Δ*) (Figure 5D) (Valdivia *et al.* 2002). However, chitin localization in this double mutant was more diffuse than in the wild-type (Figure 5D), being also partially resistant to CW. This behavior has been linked to the interaction of ScChs3 to both exomer and AP-1 complexes through specific cytosolic domains of the protein (Rockenbauch *et al.* 2012; Starr *et al.* 2012). Thus, a simple explanation for the results found in *C. albicans* may be associated with the different interactions of CaChs3 with these complexes.

However, whether or not the differences between the ScChs3 and CaChs3 proteins are enough to sustain such a hypothesis still needs to be addressed. It is known that both proteins have a very similar sequence (see Figure S6 in File S1) with >50% overall identity and 61% identity in the region containing the catalytic domain of the protein. However, the C-terminal region of CaChs3 is significantly longer. Interestingly, this lengthy C-terminal cytosolic region is also present in the Chs3 of different fungi (Figure S6B in File S1), indicating unique properties for the Chs3 from *Saccharomyces*, even between the non-CTG clade. Moreover, the N-terminal region of both proteins is also divergent and, more importantly, the first 50 amino acids are very different (Figure S6C in File S1). These N- and C-terminal regions of ScChs3 contain the domains required for its interaction with AP-1 and exomer complexes. Therefore, it is tempting to speculate that the differences in these regions between ScChs3 and CaChs3 (see Figure S6, C and D in File S1) are responsible for the different behavior. This question was addressed by

investigating the behavior of chimeric Chs3 proteins in *S. cerevisiae*. CaChs3 has been shown to be nonfunctional in *S. cerevisiae* because of its extensive retention at the ER (Jimenez *et al.* 2010). Thus, hybrid proteins were generated by replacing the N- and C-terminal regions of ScChs3 with their corresponding regions from CaChs3. The protein Chs3^{CaCT}, which contains the C-terminal region of CaChs3 (see Figure S6D in File S1 for details on the construction), was not functional since cells expressing this chimera were resistant to CW (Figure 6A) and showed reduced levels of chitin after CW staining (Figure 6B). In contrast, the protein Chs3^{CaNT}, which contains the N-terminal region (see Figure S6C in File S1 for details), was functional because its expression led to normal chitin levels. When these proteins were expressed in the *Scchs5Δ* mutant, the Chs3^{CaCT}-containing strains had no chitin and were resistant to CW. This was also the case for the strain expressing wild-type ScChs3. However, the Chs3^{CaNT} protein promoted chitin synthesis as shown by CW staining and sensitivity to this drug (Figure 6, A and B), a phenotype very similar to that observed after the expression of the L^{24A}ScChs3 protein (Starr *et al.* 2012). When expressed in the *aps1Δ* mutant, the Chs3^{CaCT} sustained partial chitin synthesis conferring CW sensitivity, while Chs3^{CaNT} behaved similar to the wild-type ScChs3. In agreement with these phenotypic results, Chs3^{CaCT}-GFP was unable to efficiently reach the neck region in the wild-type strain, although deletion of *APS1* restored the arrival of this chimeric protein at the PM (Figure 6, C and D). Moreover, Chs3^{CaNT}-GFP partially reached the PM, even in the absence of exomer (Figure 6, C and D). Therefore, our results indicate that the N- and C-terminal regions of CaChs3 are unable to efficiently mediate the interaction of these hybrid proteins with AP-1 and exomer, respectively, although it could be argued that these results were obtained with chimeric proteins in a heterologous host such as *S. cerevisiae*. However, the

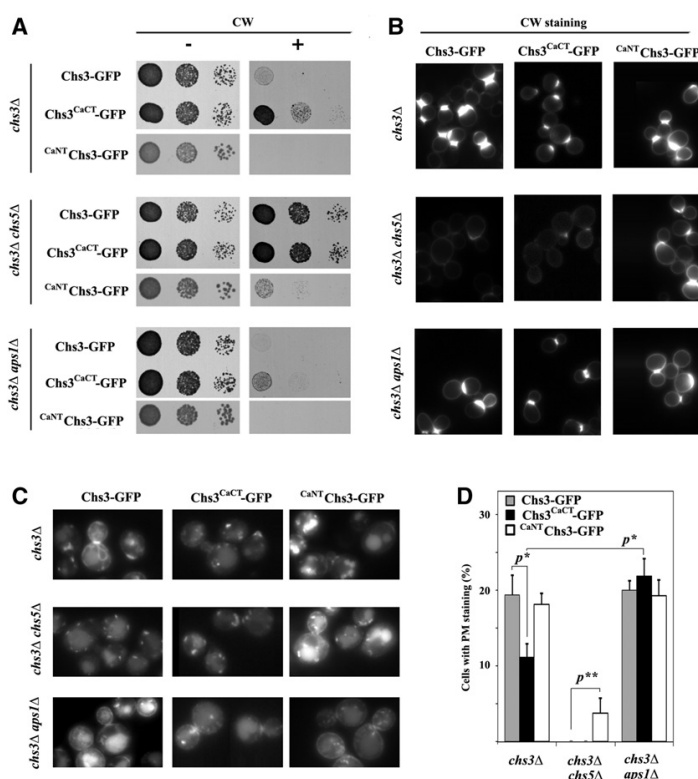


Figure 6 Functional characterization of chimeric Chs3 proteins. (A) Calcofluor (CW) resistance promoted by the chimeric proteins Chs3^{CaCT}-GFP and ^{CaNT}Chs3-GFP in the indicated *S. cerevisiae* strains compared to the wild-type ScChs3-GFP used as the control. (B) CW vital staining of the same strains as in (A). (C) Intracellular localization of ScChs3-GFP, Chs3^{CaCT}-GFP, and ^{CaNT}Chs3-GFP in the indicated strains. (D) Quantitative analysis of the images in (C) ($n = 4$, >100 cells/experiment). Note the reduced arrival of Chs3^{CaCT}-GFP at the PM, which is restored in the *aps1Δ* mutant. In contrast, ^{CaNT}Chs3-GFP arrives partially at the PM even in the *chs5Δ* mutant. See Figure S6 in File S1 and *Materials and Methods* for details on the chimeric constructs.

in vivo results obtained for *C. albicans* (Figure 4 and Figure 5) strongly support the model in which CaChs3 does not depend on exomer for Chs3 delivery to the PM, justifying the absence of exomer- and AP-1-interacting domains in this protein. Apparently, the physiological dependence on exomer and AP-1 for the trafficking of Chs3 is a distinctive characteristic of the genus *Saccharomyces*, which was acquired very late in the evolution of fungi.

Discussion

TGN is the main cargo sorting station in eukaryotic cells. At this location, and with the help of several cargo adaptor complexes, decisions for the delivery of proteins to the different cellular compartments are made (Guo *et al.* 2014). One of these cargo adaptors is exomer, a heterotetrameric complex that is conserved across fungi with no known metazoan homologs (Trautwein *et al.* 2006; Paczkowski *et al.* 2012). According to studies performed using Chs3 as an exomer-dependent cargo model, exomer is thought to mainly interact with cargos through the ChAPs (Rockenbauch *et al.* 2012; Weiskoff and Fromme 2014). These studies identified the ChAP Chs6 as the specific adaptor for this cargo. However, while Chs3 is a well-conserved protein across fungi, Chs6 is not, appearing relatively late in evolution between the *Saccharomycotina* clade (Roncero *et al.* 2016) and Figure 2).

This calls into question our current model that regards exomer as a dedicated cargo adaptor.

The results reported in this work support the idea that exomer is an evolutionarily ancient complex, and that some of its functions have been delineated along evolution as the number of ChAPs increased among some fungal groups.

Exomer, a single fungal complex diversified along *Saccharomycotina* evolution

Our extensive search for exomer components across the fungi kingdom identified a single Chs5 protein in all fungi, but a variable number of ChAPs members. Interestingly, the divergence of ChAPs correlates with the evolutionary history of fungi through a single duplication event from the single ChAPs ancestor, Bch1, early after the branching of the *Saccharomycotina* group. This was followed by a much later second duplication event associated with the WGD extensively reported for the *Saccharomyces* genus (Wang *et al.* 2009). Moreover, no loss of any of the ChAPs was detected among the different groups, except for *Microsporidia*. This highlights the ancestral significance of exomer and also the potential conservation of the functions associated with exomer. A specialization of ChAPs throughout evolution fits nicely with the current model for exomer assembly. The oldest ChAP, Bch1, seems to be the most efficient in assembling exomer complexes at the TGN, a function partially retained by its close homolog Bud7 (Huranova *et al.* 2016). Accordingly, Bch1 is the ChAP protein

with the largest capacity to promote the membrane remodeling activity associated with exomer *in vitro* (Paczkowski and Fromme 2014). By contrast, Chs6 presents a more specialized function such as a dedicated cargo adaptor (Paczkowski and Fromme 2014). Moreover, our results indicate that Bch2 could have acquired distinctive characteristics owing to the late incorporation of a specific region within its C-terminal domain.

This model raises the significant biological question of whether the role of exomer as a cargo adaptor is evolutionarily conserved. If this is not the case, then what is the conserved function of exomer?

Exomer probably has an ancestral role in the intracellular transport of multiple TM proteins

The *S. cerevisiae* exomer mutants showed additional phenotypic traits that were not associated with known cargos such as sensitivity to alkali metals, hygromycin, or ammonium. Sensitivity to sodium and lithium in *S. cerevisiae* has been recently associated with defects in *Ena1*, a protein that behaves as a nonconventional cargo for exomer (Anton *et al.* 2017). Interestingly, the *Klchs5Δ* and double *Klbch1Δ chs6Δ* mutants also showed lithium sensitivity, but neither of the individual ChAPs mutants, *Klbch1Δ* or *Klchs6Δ*, exhibited this phenotype, clearly indicating functional redundancy between both ChAPs. Similar results were obtained for the sensitivity to hygromycin. However, in *S. cerevisiae* there is limited redundancy between *Chs6/Bch2* and *Bch1/Bud7* pairs based on the different phenotypes exhibited by the double mutants, suggesting a functional specialization of ChAPs along the evolutionary transit between the clades represented by *S. cerevisiae* and *K. lactis*.

The results obtained with respect to ammonium toxicity, although more difficult to interpret, point in the same direction. The absence of the *Bch1/Bud7* pair would be directly responsible for ammonium toxicity in *S. cerevisiae*, with the *Chs6/Bch2* pair playing a minor role. The *K. lactis chs5Δ* mutant was insensitive to ammonium but did show much reduced growth on YES medium. This effect was probably due to a defective intake of external amino acids, since this effect was reversed when the media was supplemented with additional nitrogen sources. This phenotype is probably linked to the ammonium toxicity observed for *S. cerevisiae*, because it has been shown to be ameliorated by the extrusion of intracellular amino acids through the *Ssy1-Ptr3-Ssy5* (SPS) sensing pathway induced amino acid transporters (Hess *et al.* 2006). Defective transport of amino acids in the exomer mutants could be responsible for the ammonium toxicity in *S. cerevisiae*, and also for the defective use of amino acids as a nitrogen source in *K. lactis*. Moreover, the restoration of growth on YES medium, produced by Asp or Glu in *K. lactis*, was only achieved when one ChAP was present, a clear indication that the use of these amino acids depends on a functional exomer, which highlights the functional redundancy between both ChAPs in *K. lactis*. At present, it is unclear whether these exomer-associated defects are due to a defective transport of specific amino acid permeases to the PM or a more general defect in the SPS-sensing system.

Interestingly, the exomer mutants from all the different organisms tested share a slight sensitivity to rapamycin. This phenotype is easily associated with a defective use of nitrogen sources that might explain the evolutionary conservation of exomer across fungi and provides the basis for a more thorough search regarding the ancestral molecular role of exomer.

The unique properties of exomer as a cargo adaptor of Chs3 in *S. cerevisiae*

Exomer has been defined as a cargo adaptor in *S. cerevisiae* owing to the identification of three cargos—*Chs3*, *Fus1* and *Pin2*—which depend on their interaction with exomer for arrival at the PM (Trautwein *et al.* 2006; Barfield *et al.* 2009; Ritz *et al.* 2014). However, only *Chs3* has been clearly shown to depend on the dedicated ChAP protein *Chs6* for its interaction with exomer (Rockenbauch *et al.* 2012). Based on this, the *Scchs5Δ* and *Scchs6Δ* mutants share strongly reduced chitin levels and CW resistance (Roncero 2002). However, deletion of the common exomer component *Chs5* in *U. maydis*, *C. albicans*, or *K. lactis* did not produce a significant reduction in chitin synthesis, despite the fact that the *Chs3* homologs of *U. maydis* and *C. albicans* are evolutionarily conserved and have been shown to be responsible for most chitin synthesis in these organisms (Mio *et al.* 1996; Weber *et al.* 2006). Thus, this result argues against a general role of exomer as a cargo adaptor in fungi. *Chs6* acts at the exomer as a cargo adaptor for *ScChs3* by interacting directly with its C-terminal cytosolic domain (Rockenbauch *et al.* 2012). However, the replacement of the C-terminal region of *ScChs3* by its counterpart region from *CaChs3* led to a protein that is not exported from TGN, probably due to its inability to interact with *Chs6*. Interestingly, the C-terminal region of *Chs3* is not conserved across fungi, suggesting that interaction between *Chs3* and exomer could have been developed late along Saccharomycotina evolution, which is in concordance with a late specialization of the members of the ChAPs family after the WGD.

However, this does not explain the absolute requirement of exomer for *ScChs3* trafficking to the PM. An additional characteristic of all known exomer cargos is their interaction with the AP-1 complex. Moreover, *ScChs3* interacts with AP-1 through a distinct region on its N-terminal cytosolic domain (Starr *et al.* 2012; Weiskoff and Fromme 2014). This region is poorly conserved across fungi, and the replacement of the *ScChs3* N-terminal region by the corresponding region from *CaChs3* produced a chimeric protein that interacted poorly with AP-1 based on phenotypic analysis. These results suggest that *CaChs3* interacts poorly with exomer and AP-1 complexes. The *in vivo* results obtained in *C. albicans* are also consistent with this interpretation, because the exomer mutant *Cachs5Δ* shows a reduced polarization of *CaChs3* resulting in a delocalized deposition of chitin. This situation is similar to that described for the *S. cerevisiae chs5Δ aps1Δ* double mutant, and thus is fully compatible with the absence of an *in vivo* interaction of *CaChs3* with exomer and AP-1 complexes in *C. albicans* cells.

Pin2 is another *bona fide* cargo of exomer in *S. cerevisiae*, for which *Bch2* is the probable cargo adaptor (Ritz *et al.*

2014; Anne Spang, unpublished results); therefore, it would be interesting to test our model using a different cargo. Unfortunately, *Pin2* is poorly conserved across fungi, making it an unsuitable experimental model. Nonetheless, our results strongly support a model in which the role of exomer as cargo adaptor for *Chs3* has evolved in *S. cerevisiae* linked to the engagement of AP-1 in the transport of *Chs3*.

The results presented within this paper recapitulate the evolutionary story of exomer and highlight its progressive specialized role as a cargo adaptor along the Saccharomycotina after the WGD event, a process that is compatible with the maintenance of its ancestral functions in the transport of diverse TM proteins. This model is fully compatible with the role proposed for the most ancestral ChAP, *Bch1*, in vesicle generation at the TGN (Paczkowski and Fromme 2014), and the absence of any know cargos for this protein or its close relative *Bud7*. Moreover, it has not been possible to identify any role for exomer as a cargo adaptor in *C. albicans* and *K. lactis*, once more indicating that this functional specialization most probably occurred very late. The absence of any relevant phenotypes for the exomer mutants of *U. maydis* and *C. albicans* still remains intriguing, and raises questions concerning the most ancestral role of exomer. This would most likely become relevant during stressful conditions, as has been recently reported for *S. pombe* (Hoya *et al.* 2017). However, fungi are adapted to very different ecological niches, which would require additional efforts to identify common stressful conditions for the characterization of the phenotypes associated with the absence of exomer in different fungi.

Acknowledgments

We thank Emma Keck for editing the English, A. Spang and J. Ariño for the many useful discussions that took place throughout this work, R. Valle for her technical assistance at the Roncero Laboratory, S. Chumpen for her help with the overexpression screen, and especially technical help from J. Perez, C. R. Vazquez, and J. J. Heinisch on the work carried out with *U. maydis*, *C. albicans*, and *K. lactis*, respectively. C.A. is supported by a University of Salamanca predoctoral fellowship. C.R. was supported by grant SA073U14 from the Regional Government of Castile and Leon, and by grant BFU2013-48582-C2-1-P from the Comision Interministerial de Ciencia y Tecnologia/Fondo Europeo de Desarrollo Regional Spanish program. J.V.T. is a career researcher at Consejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnológicas, Argentina, and is supported by grant PICT 2013-0288 from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina.

Literature Cited

Anton, C., B. Zanolari, I. Arcones, C. Wang, J. M. Mulet *et al.*, 2017 Involvement of the exomer complex in the polarized transport of *Ena1* required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol. Biol. Cell* 28: 3672–3685. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-09-0549>

Arcones, I., and C. Roncero, 2016 Monitoring chitin deposition during septum assembly in budding yeast. *Methods Mol. Biol.* 1369: 59–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3145-3_5

Arcones, I., C. Sacristán, and C. Roncero, 2016 Maintaining protein homeostasis: early and late endosomal dual recycling for the maintenance of intracellular pools of the plasma membrane protein *Chs3*. *Mol. Biol. Cell* 27: 4021–4032. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-04-0239>

Banuett, F., and I. Herskowitz, 1989 Different alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5878–5882. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.15.5878>

Barfield, R. M., J. C. Fromme, and R. Schekman, 2009 The exomer coat complex transports *Fus1p* to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol. Biol. Cell* 20: 4985–4996. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-04-0324>

Barlow, L. D., J. B. Dacks, and J. Wideman, 2014 From all to (nearly) none. *Cell. Logist.* 4: e28114. <https://doi.org/10.4161/cl.28114>

Calderón-Noreña, D. M., A. González-Novo, S. Orellana-Muñoz, P. Gutiérrez-Escribano, Y. Arnáiz-Pita *et al.*, 2015 A single nucleotide polymorphism uncovers a novel function for the transcription factor *Ace2* during *Candida albicans* hyphal development. *PLoS Genet.* 11: e1005152. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005152>

Carlson, M., and D. Botstein, 1982 Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28: 145–154. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90384-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90384-1)

Copic, A., T. L. Starr, and R. Schekman, 2007 *Ent3p* and *Ent5p* exhibit cargo-specific functions in trafficking proteins between the trans-Golgi network and the endosomes in yeast. *Mol. Biol. Cell* 18: 1803–1815. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-11-1000>

Daboussi, L., G. Costaguta, and G. S. Payne, 2012 Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* 14: 239–248. <https://doi.org/10.1038/ncb2427>

Enloe, B., A. Diamond, and A. P. Mitchell, 2000 A single-transformation gene function test in diploid *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 182: 5730–5736. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5730-5736.2000>

Gola, S., R. Martin, A. Walther, A. Dünkler, and J. Wendland, 2003 New modules for PCR-based gene targeting in *Candida albicans*: rapid and efficient gene targeting using 100 bp of flanking homology region. *Yeast* 20: 1339–1347. <https://doi.org/10.1002/yea.1044>

Goldstein, A. L., and J. H. McCusker, 1999 Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541–1553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)

Grigoriev, I., R. Nikitin, S. Haridas, A. Kuo, R. Ohm *et al.*, 2014 MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Res.* 42: D699–D704. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1183>

Guo, Y., D. W. Sirkis, and R. Schekman, 2014 Protein sorting at the trans-Golgi network. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30: 169–206. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100913-013012>

Heinisch, J. J., U. Buchwald, A. Gottschlich, N. Heppeler, and R. Rodicio, 2010 A tool kit for molecular genetics of *Kluyveromyces lactis* comprising a congenic strain series and a set of versatile vectors. *FEMS Yeast Res.* 10: 333–342. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00604.x>

Hess, D. C., W. Lu, J. D. Rabinowitz, and D. Botstein, 2006 Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast. *PLoS Biol.* 4: e351. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040351>

Hoya, M., F. Yanguas, S. Moro, C. Prescianotto-Baschong, C. Doncel *et al.*, 2017 Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics* 205: 673–690. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.193458>

- Huranova, M., G. Muruganandam, M. Weiss, and A. Spang, 2016 Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep.* 17: 202–219. <https://doi.org/10.15252/embr.201540795>
- Jimenez, C., C. Sacristan, M. I. Roncero, and C. Roncero, 2010 Amino acid divergence between the CHS domain contributes to the different intracellular behaviour of Family II fungal chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.* 47: 1034–1043. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.013>
- Lam, K. K., M. Davey, B. Sun, A. F. Roth, N. G. Davis *et al.*, 2006 Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* 174: 19–25. <https://doi.org/10.1083/jcb.200602049>
- Lenardon, M. D., S. A. Milne, H. M. Mora-Montes, F. A. Kaffarnik, S. C. Peck *et al.*, 2010a Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *J. Cell Sci.* 123: 2199–2206. <https://doi.org/10.1242/jcs.060210>
- Lenardon, M. D., C. A. Munro, and N. A. Gow, 2010b Chitin synthesis and fungal pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 13: 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.05.002>
- Longtine, M. S., A. McKenzie, D. J. Demarini, N. G. Shah, A. Wach *et al.*, 1998 Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199807\)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U)
- Maresova, L., and H. Sychrova, 2005 Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae kha1* deletion mutants. *Mol. Microbiol.* 55: 588–600. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04410.x>
- Markovich, S., A. Yekutieli, I. Shalit, Y. Shadkhan, and N. Osherov, 2004 Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 3871–3876. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.10.3871-3876.2004>
- Mio, T., T. Yabe, M. Sudoh, Y. Satoh, T. Nakajima *et al.*, 1996 Role of three chitin synthase genes in the growth of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 178: 2416–2419. <https://doi.org/10.1128/jb.178.8.2416-2419.1996>
- Paczkowski, J. E., and J. C. Fromme, 2014 Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev. Cell* 30: 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.07.014>
- Paczkowski, J. E., B. C. Richardson, A. M. Strassner, and J. C. Fromme, 2012 The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* 31: 4191–4203. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.268>
- Parsons, A. B., R. L. Brost, H. Ding, Z. Li, C. Zhang *et al.*, 2004 Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.* 22: 62–69. <https://doi.org/10.1038/nbt919>
- Rippert, D., K. Backhaus, R. Rodicio, and J. J. Heinisch, 2017 Cell wall synthesis and central carbohydrate metabolism are interconnected by the SNF1/Mig1 pathway in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Cell Biol.* 96: 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2016.12.004>
- Ritz, A. M., M. Trautwein, F. Grassinger, and A. Spang, 2014 The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif. *Cell Rep.* 7: 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.02.026>
- Rockenbach, U., A. M. Ritz, C. Sacristan, C. Roncero, and A. Spang, 2012 The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Mol. Biol. Cell* 23: 4402–4415. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-12-1015>
- Roncero, C., 2002 The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41: 367–378. <https://doi.org/10.1007/s00294-002-0318-7>
- Roncero, C., A. Sanchez-Diaz, and M. H. Valdivieso, 2016 Chitin synthesis and fungal morphogenesis, pp. 167–190 in *The Mycota* III. *Biochemistry and Molecular Biology*, edited by D. Hoffmeister. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27790-5_9
- Rose, M. D., F. Winston, and P. Hieter, 1990 *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Sacristan, C., A. Reyes, and C. Roncero, 2012 Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol. Microbiol.* 83: 1124–1135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07995.x>
- Sacristan, C., J. Manzano-Lopez, A. Reyes, A. Spang, M. Muniz *et al.*, 2013 Dimerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol. Microbiol.* 90: 252–266.
- Sanchatjate, S., and R. Schekman, 2006 Chs5/6 complex: a multi-protein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol. Biol. Cell* 17: 4157–4166. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-03-0210>
- Santos, B., and M. Snyder, 1997 Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell Biol.* 136: 95–110. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.1.95>
- Santos, B., and M. Snyder, 2003 Specific protein targeting during cell differentiation: polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 2: 821–825. <https://doi.org/10.1128/EC.2.4.821-825.2003>
- Sanz, M., L. Carrano, C. Jimenez, G. Candiani, J. A. Trilla *et al.*, 2005 *Candida albicans* strains deficient in *CHS7*, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* 151: 2623–2636. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28093-0>
- Sato, M., S. Dhut, and T. Toda, 2005 New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22: 583–591. <https://doi.org/10.1002/yea.1233>
- Schaub, Y., A. Dünkler, A. Walther, and J. Wendland, 2006 New pFA-cassettes for PCR-based gene manipulation in *Candida albicans*. *J. Basic Microbiol.* 46: 416–429. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510133>
- Schlacht, A., E. K. Herman, M. J. Klute, M. C. Field, and J. B. Dacks, 2014 Missing pieces of an ancient puzzle: evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a016048. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016048>
- Spang, A., 2015 The road not taken: less traveled roads from the TGN to the plasma membrane. *Membranes (Basel)* 5: 84–98. <https://doi.org/10.3390/membranes5010084>
- Starr, T. L., S. Pagant, C. W. Wang, and R. Schekman, 2012 Sorting signals that mediate traffic of chitin synthase III between the TGN/endosomes and to the plasma membrane in yeast. *PLoS One* 7: e46386.
- Stuckey, S., K. Mukherjee, and F. Storici, 2011 In vivo site-specific mutagenesis and gene collage using the delitto perfetto system in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol. Biol.* 745: 173–191. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-129-1_11
- Terfrüchte, M., B. Joehnk, R. Fajardo-Somera, G. H. Braus, M. Riquelme *et al.*, 2014 Establishing a versatile Golden Gate cloning system for genetic engineering in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 62: 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2013.10.012>
- Thompson, J. R., E. Register, J. Curotto, M. Kurtz, and R. Kelly, 1998 An improved protocol for the preparation of yeast cells for transformation by electroporation. *Yeast* 14: 565–571. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980430\)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980430)14:6<565::AID-YEA251>3.0.CO;2-B)
- Tonikian, R., X. Xin, C. P. Toret, D. Gfeller, C. Landgraf *et al.*, 2009 Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol.* 7: e1000218. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000218>

- Trautwein, M., C. Schindler, R. Gauss, J. Dengjel, E. Hartmann *et al.*, 2006 Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* 25: 943–954. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601007>
- Trilla, J. A., A. Duran, and C. Roncero, 1999 Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145: 1153–1163. <https://doi.org/10.1083/jcb.145.6.1153>
- Trueheart, J., J. D. Boeke, and G. R. Fink, 1987 Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2316–2328. <https://doi.org/10.1128/MCB.7.7.2316>
- Tsukuda, T., S. Carleton, S. Fotheringham, and W. K. Holloman, 1988 Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol. Cell. Biol.* 8: 3703–3709. <https://doi.org/10.1128/MCB.8.9.3703>
- Valdivia, R. H., D. Baggot, J. S. Chuang, and R. Schekman, 2002 The yeast Clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev. Cell* 2: 283–294. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00127-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00127-2)
- Wang, C. W., S. Hamamoto, L. Orci, and R. Schekman, 2006 Exomer: a coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* 174: 973–983. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605106>
- Wang, H., Z. Xu, L. Gao, and B. Hao, 2009 A fungal phylogeny based on 82 complete genomes using the composition vector method. *BMC Evol. Biol.* 9: 195. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-195>
- Weber, I., D. Assmann, E. Thines, and G. Steinberg, 2006 Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 225–242. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037341>
- Weiskoff, A. M., and J. C. Fromme, 2014 Distinct N-terminal regions of the exomer secretory vesicle cargo Chs3 regulate its trafficking itinerary. *Front. Cell Dev. Biol.* 2: 47. <https://doi.org/10.3389/fcell.2014.00047>
- Ziman, M., J. S. Chuang, M. Tsung, S. Hamamoto, and R. Schekman, 1998 Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9: 1565–1576. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.6.1565>

Communicating editor: J. Heitman

OPEN Evolutionary cell biology traces the rise of exomer complex function in Fungi from an ancient eukaryotic component

Inmaculada Ramirez-Macias¹, Lael D. Barlow¹, Carlos Anton², Anne Spang³, Cesar Roncero², and Joel B. Dacks^{1*}

Cargo is transported from the Trans-Golgi Network to the Plasma Membrane by adaptor complexes, which are pan-eukaryotic components. However, in yeast, cargo can also be exported by the exomer complex, a heterotetrameric protein complex consisting of two copies of Chs5, and any two members of four paralogous proteins (ChAPs). To understand the larger relevance of exomer, its phylogenetic distribution and function outside of yeast need to be explored. We find that the four ChAP proteins are derived from gene duplications after the divergence of *Yarrowia* from the remaining Saccharomycotina, with BC8 paralogues (Beh2 and Chs6) being more diverged relative to the BB8 paralogues (Beh1 and Bud7), suggesting neofunctionalization. Outside Ascomycota, a single preduplicate ChAP is present in nearly all Fungi and in diverse eukaryotes, but has been repeatedly lost. Chs5, however, is a fungal specific feature, appearing coincidentally with the loss of AP4. In contrast, the ChAP protein is a wide-spread, yet uncharacterized, membrane-trafficking component, adding one more piece to the increasingly complex machinery deduced as being present in our ancient eukaryotic ancestor.

Trafficking through an elaborate set of endomembrane organelles allows for spatially distributed and compartmentalized chemical microenvironments that are required for proper tissue and cellular function in eukaryotes. It is crucial for normal cellular activity, with dysregulation of membrane-trafficking being implicated in a wide range of human diseases¹⁻³. As a feature of all eukaryotic cells, membrane-trafficking is also heavily implicated in the pathogenic mechanisms of a wide range of microbial organisms that impact our health and livelihoods. The process of membrane trafficking distributes material throughout the cell and mediates its release or internalization from the extracellular space. Such internalization is undertaken by the endocytic pathway, while release of material and presentation on the cell surface is mediated by the secretory pathway⁴.

This secretory pathway consists of distinct steps for anterograde and retrograde transport between the membrane compartments. Transport from the endoplasmic reticulum to the plasma membrane via various intracellular organelles is known as anterograde transport⁵. The *trans*-Golgi Network (TGN) is the penultimate compartment in anterograde transport for most secreted proteins, with traffic from the TGN to the plasma membrane (PM) being the final step in the process.

¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta. ²Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG) and Departamento de Microbiología y Genética, CSIC-Universidad de Salamanca, 37007 Salamanca, Spain. ³Biozentrum, University of Basel, Basel, Switzerland. *Corresponding Author: Joel B. Dacks, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Email=dacks@ualberta.ca

Extensive cell biological work in animal and fungal model systems has identified a sophisticated set of molecular machinery responsible for membrane trafficking^{4,6}. Selection of cargo for inclusion into transport vesicles between organelles within the late secretory and endocytic system is performed by a related set of heterotetrameric protein complexes called the Adaptor Protein (AP) complexes. During transport from the TGN to the PM, cargo can use different routes (Fig. 1A). The cargo may traffic to the lysosome, mediated by the AP-3 complex^{7,8}. Alternately it can go directly from the TGN to the PM (with or without endosomal intermediates) mediated by AP-1 or AP-4 complex binding⁹.

Besides these pathways, cargos can be exported from the TGN to the PM in an AP-independent manner. One such example is the exomer-mediated pathway⁹. Exomer was discovered in yeast as being involved in the transport of chitin synthase Chs3 to the plasma membrane^{10,11}. It is an Arf1 GTPase-dependent protein complex¹⁰⁻¹², consisting of two copies of the core protein Chs5, and any two members of four paralogous proteins known as the ChAPs (for Chs5 and Arf1 binding Proteins): Chs6, Bud7, Bch1 and Bch2¹⁰⁻¹³. (Fig. 1B). Theoretically, ten distinct variants of exomer tetramers can exist, because different combinations of ChAPs can bind to the Chs5 dimer, but only a subset of all possible complexes is probably ever formed in the cell in vivo¹⁴. Although the ChAPs are homologous proteins, they vary in their contribution to exomer assembly¹⁴.

To date less than a handful of bona fide exclusively exomer-dependent cargoes have been reported (Chs3, Fus1, Pin2)^{10,15,16}, none of which are conserved in mammalian cells. More recently, however, this exclusivity of exomer cargo selection was questioned as some plasma membrane proteins may use either the conventional or the exomer-dependent route¹⁷. The ion transporter Ena1 is such a protein, because exomer-dependent polarized localization of Ena1 is necessary to counteract toxic cation concentrations¹⁷, and Ena1 is conserved from yeast to mammals.

Exomer has thus far only been characterized in yeasts¹⁸. Membrane-trafficking, however, is a feature of all eukaryotic cells. A growing body of molecular evolutionary studies has demonstrated the conservation across eukaryotic diversity of most of the major protein families implicated in membrane trafficking¹⁹. This means that the ancestor of extant eukaryotes (LECA) possessed a sophisticated endomembrane complement. These studies also provide a context for which aspects of cell biological models of membrane-trafficking, derived from work in animals and fungi, are broadly applied to eukaryotic cells in general. The APs and their related complexes (COPI, TSET) have been shown as ancient features of the eukaryotic cell²⁰⁻²³. However, several of these complexes (AP4, AP5, TSET) have also been shown to be lost repeatedly in the course of eukaryotic evolution^{19,23}, and additional lineage specific complexes derived from APs (eg. GGAs, Stonins) have also been identified²⁴⁻²⁶. Indeed, the possibility has been raised that exomer may be homologous to the ear domain of the large subunit of Adaptins or other trafficking complexes¹². A previous report noted the presence of ChAP proteins in ciliates and red algae and raised the hypothesis that exomer was an ancient feature of the eukaryotic trafficking system¹⁰. However, this was based on limited genomic sampling, over

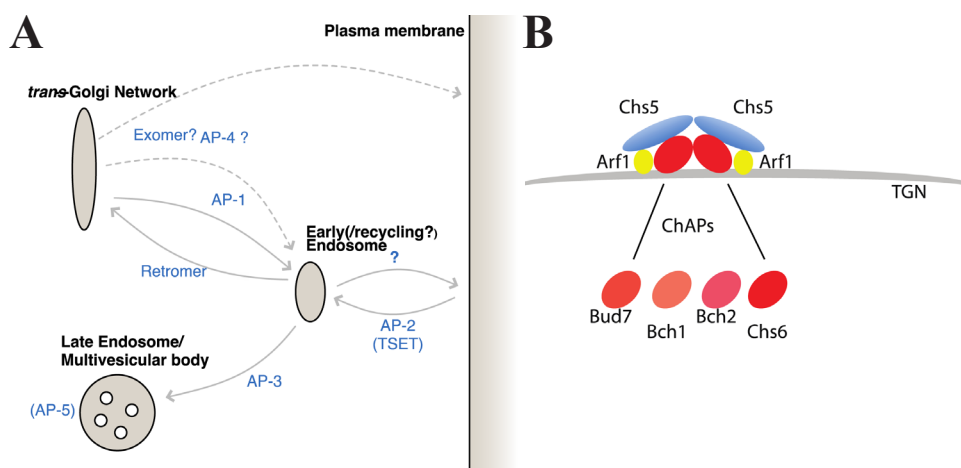


Figure 1. Membrane-trafficking pathways and the exomer complex (A) Schematic of membrane trafficking pathways between the *trans*-Golgi Network and Plasma Membrane identified in eukaryotes. (B) Schematic of exomer components as characterized in *S. cerevisiae*. Exomer consists of a homodimer of Chs5, and each of the Chs5 has one binding site for a ChAP (Bud7, Bch1, Bch2, Chs6). Different combinations of ChAPs can bind to Chs5.

a decade ago. A more systematic examination of exomer component distribution and phylogeny is needed.

In this study, we perform an extensive evolutionary analysis of the exomer complex, to better understand its history and the extent to which exomer is a feature of the general eukaryotic membrane-trafficking complement. We also investigate the functional homology of non-ascomycete exomer components through microscopy and heterologous complementation, in order to assess exomer relevance in diverse fungi.

Results

Bch1, Bch2, Chs6, Bud7 are *Saccharomyces*-specific proteins but the exomer complex is likely present across the Fungi

Exomer subunits have been best characterized in *Saccharomyces cerevisiae*, but also reported in *Schizosaccharomyces pombe*¹⁸, and noted to be present in various fungal genomic databases. In order to more systematically investigate the presence and history of exomer subunits outside of *S. cerevisiae* and other Ascomycota, we used comparative genomics to search diverse eukaryotic genomes. Beginning with the Ascomycete fungi, we found candidate orthologues of the four related ChAP proteins (Bud7, Bch1, Chs6, Bch2) and phylogenetic analysis was performed to assess their distribution and inter-relation (Fig. 2). With very robust support, we find that Bch1 and Bud7 are the result of a specific duplication (node uniting the green and purple boxes: 1.00/100% posterior prob-ability/bootstrap support) very near the divergence of the *Saccharomyces*, as are Bch2 and Chs6 (node uniting the orange and blue boxes clades-1.00/89%). Furthermore, the gene duplication giving rise to these two larger encompassing clades (node uniting the yellow and pink boxed clades-0.93/69) likely took place prior to the divergence of *Yarrowia lipolytica* with the rest of the Saccharomycotina. To more easily refer to these clades, we discuss the clade of Bud7 plus Bch1 and its preduplicate paralogues as BB8 (Bch1 + Bud7= BB8) while Bch2, Chs6 and the preduplicate paralogues are referred to as BC8 (Bch2 + Chs6=BC8).

Expanding the search outside the Ascomycota identified a single homologue related to the four *S. cerevisiae* ChAP proteins, referred to simply as ChAP, present in nearly all Fungi (Fig. 3, Supplementary Table S1). Searches for Chs5 similarly revealed robust orthologues in the diversity of fungal genomes. We speculate the presence of an exomer complex and exomer-trafficking pathways in Fungi, based on the presence of the central Chs5 protein and homodimer of the ChAP proteins.

In support of the prediction of a functional exomer complex in Fungi, at least 46 of the 69 exomer subunits identified in our homology searches were listed as having gene expression support in their respective genomic databases (Supplementary Table S1). This expression data inherently supports the genes as valid and not merely pseudogenes or erroneous gene predictions (Supplementary Table S1).

The initial duplication of ChAP allowed for neofunctionalization in Fungi.

Having detailed the ChAPs complement in Fungi and clarified the timing of the duplications, we wanted to better understand the functional evolution amongst ChAP protein paralogues. Upon gene duplication, several fates are possible including separation of ancestral function to the paralogues (i.e. subfunctionalization) or retention of ancestral function in one paralogue and gain of novel function (i.e. neofunctionalization) in the other²⁷. These different options are manifested as sequence divergence from the pre-duplicated proteins. We assume that equal divergence between paralogue sets is the result of subfunctionalization or simply accumulation of changes due to neutral evolutionary processes, while unequal divergence between lineages suggests neofunctionalization. We assessed the rate of change in ChAP proteins in two ways. Firstly, it is apparent from the branch lengths observed in Fig. 2 that the paralogues within the BC8 clade (pink box) are more divergent than are the paralogues within the BB8 clade (yellow box) suggesting that neofunctionalization and retention had taken place in the two respective clades.

Secondly, because phylogenies are based only on the positions that are homologous to all genes considered and so some sequence data are excluded from the analysis, we calculated all possible pairwise percent sequence identities between the various ChAP proteins. Using these percentages, we explicitly tested the hypothesis that either Bud7 or Bch1 had neofunctionalized relative to the other by assessing whether either sets had higher percent identity to the preduplicate BB8 paralogues. Likewise, we explicitly tested the hypothesis that Bch2 or Chs6 had neofunctionalized by assessing whether either set had higher percent identity to the preduplicated BC8 genes. As seen in Fig. 4A, none of these comparisons were strongly different. We also tested the idea that one of Bch1, Bch2, Bud7 or Chs6 was significantly less diverged from the preduplicate ChAP sequences. Again, we found none of the *Saccharomyces*-specific protein sequences to show a higher percent identity to the preduplicate ChAP proteins than any of the others (Fig. 4B). However, consistent with the observations from the phylogeny, the sequences from the BC8 clade appeared to be more diverged than those of the BB8 clade. When considering all sequences, this was not outside the standard deviation of the average pairwise identity (Fig. 4C). However, when we accounted for the over-representation of *Saccharomyces* sequences (that would be counted as individual data points but yield nearly identical

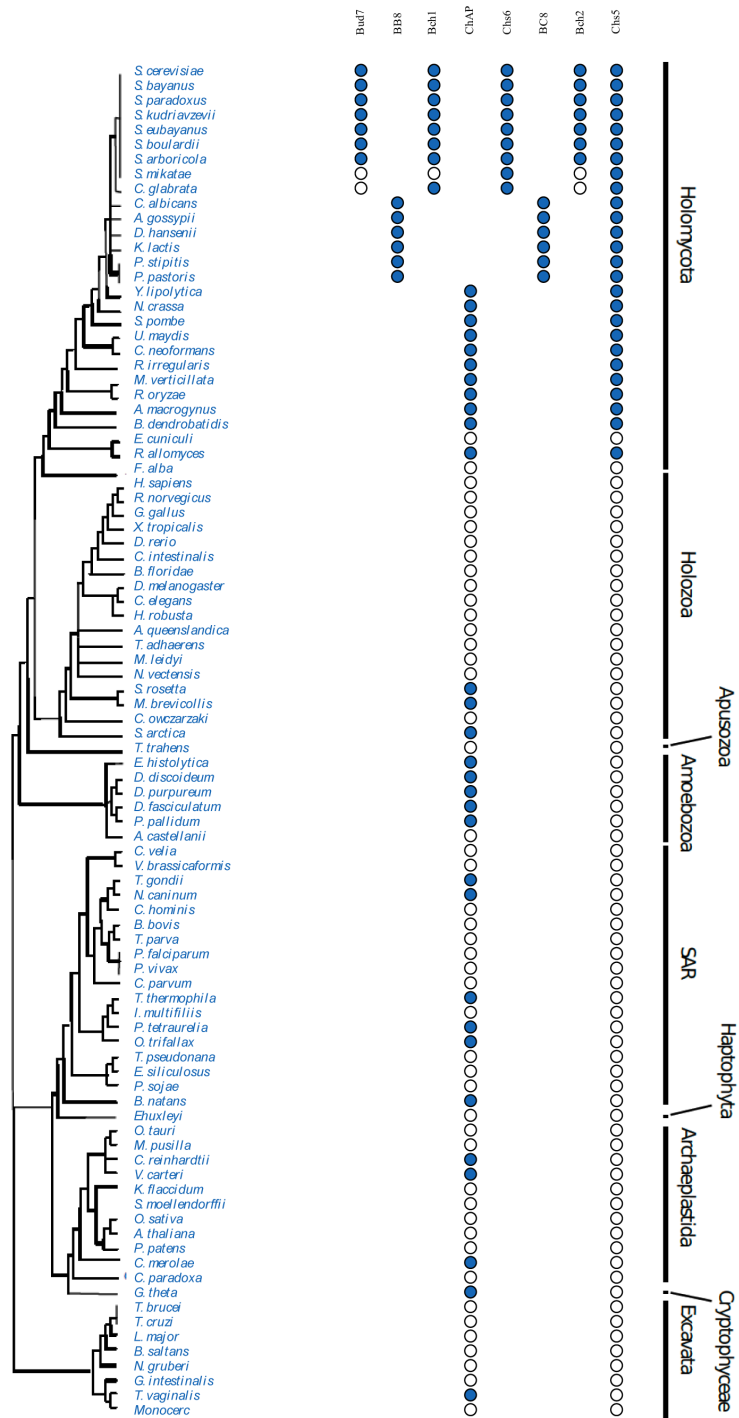


Figure 3. Dot plot of exomer orthologues. This diagram illustrates the data from homology searching (Supplementary Table S1) and supported by phylogenetic analysis (Fig. 2) showing the presence of duplicated ChAP components in the Saccharomycotina and the presence of a pre-duplicated ChAP protein in diverse eukaryotic lineages, as well as Chs5 as a pan-fungal component. Filled dots indicate the identification of an orthologue while empty indicates that no orthologue was found. **Relationships shown are based on [51](#), [52](#), [53](#).

values and thus bias the calculation), by including only the *S. cerevisiae* sequences, we found that the BC8 sequences were more diverged (BB8=55.84% \pm 4.6 vs BC8=43.34 \pm 6.8), outside of one standard deviation (Fig. 4C). These analyses, and the assumption that sequence divergence reflects functional divergence, all suggest that the first gene duplication that gave rise to the BB8 and BC8 clades resulted in a neofunctionalization of the BC8 paralogues. The BB8 genes appear to be less diverged and thus are predicted to be more like the ancestral ChAP protein.

ChAP, but not exomer, is a widespread feature of the eukaryotic membrane-trafficcking complement.

The presence of exomer subunits in Fungi and earlier reports of exomer subunits in mycetozoa, red algae and ciliates¹⁰ prompted us to search for homologues in the rest of eukaryotes. Despite finding common signatures for BRCT and FN3 domains (see below), we could find no credible orthologues of Chs5 in diverse eukaryotes outside of the Fungi, using BLAST and HMMER homology-searching methods.

By contrast, we were able to identify ChAP orthologues in genomes of organisms from across the breadth of eukaryotes (Fig. 3). The pattern of a broad evolutionary distribution, but frequently with only selected organisms possessing at least one ChAP protein, was further confirmed by searches that used the relevant member of the supergroup as the target database for reciprocal best hit validation. We suggest that the ChAP

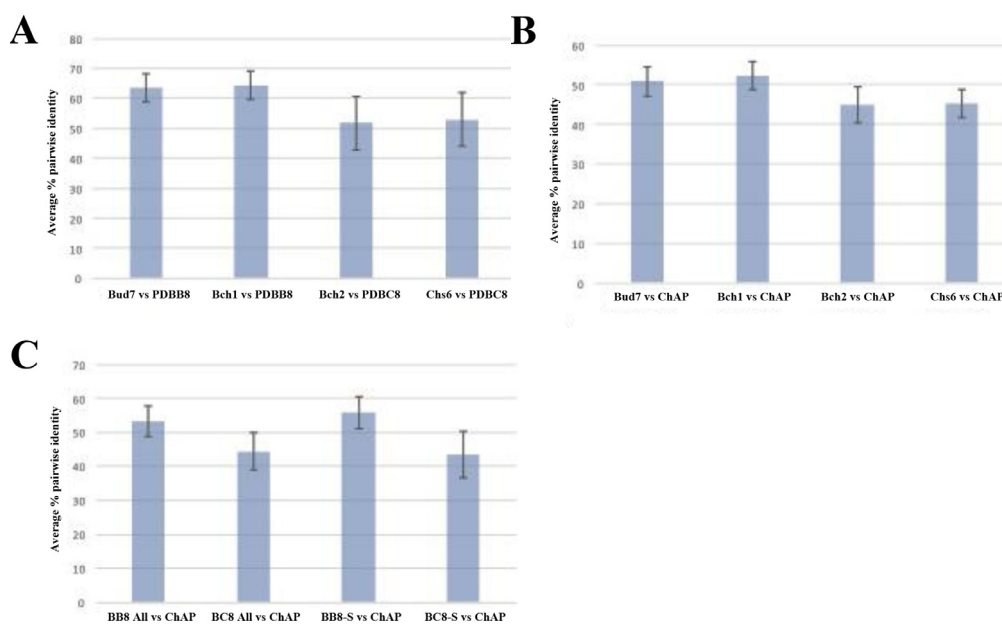


Figure 4. Percent pairwise identities of ChAP proteins across Fungi. (A) Comparisons of each *Saccharomyces*-specific proteins versus the preduplicate genes from the BB8 and BC8 clades. (B) Comparisons of each *Saccharomyces*-specific protein versus preduplicate ChAP genes from non-ascomycete fungi. (C) Comparisons of all BB8 and all BC8 versus the preduplicate ChAP genes from non-ascomycete fungi followed by BB8 and BC8 balanced to have a single ascomycete genus represented. This final comparison is the only one with non-overlapping errors bars, showing a robust difference in values. Error bars show one standard deviation of the average percent ID in all pairwise comparisons between the sets. The taxon sets were defined according to the Annotation labels in Supplementary Table S1 and defined as follows. Bud7: Bud7Spar, Bud7Scer, Bud7Sbou, Bud7Sbay, Bud7Seub, Bud7Sar. Bch1: Bch1Sbay, Bch1Seub, Bch1Skud, Bch1Sar, Bch1Spar, Bch1Scer, Bch1Sbou. Bch2: Bch2Scer, Bch2Sbou, Bch2Spar, Bch2Skud, Bch2Sar, Bch2Sbay, Bch2Seub. Chs6: Chs6Sbay, Chs6Seub, Chs6Sar, Chs6Skud, Chs6Smik, Chs6Scer, Chs6Sbou, Chs6Spar. PDDB8: BB8Ppas, BB8Calb, BB8Dhan, BB8Psti, BB8Klac, BB8Ago. PDBC8: BC8Klac, BC8Cgla, BC8Agos, BC8Psti, BC8Ppas, BC8Calb, BC8Dhan. ChAP: ChAPYlip, ChAPNcra, ChAPAmac, ChAP-Bden, ChAPSpom, ChAPCneo, ChAPUmay, ChAPMver, ChAPRirr, ChAPRory. BB8All: The set of Bud7+Bch1+PDDB8. BC8All: The set of Bch2+Chs6+PDBC8. BB8-B: The set of PDDB8+ Bud7Scer+Bch1Scer. BC8-B: The set of PDBC8+ Bch2Scer + Chs6Scer.

protein is a component of the trafficking system of diverse eukaryotes, and was present in the LECA, but may be expendable and has been lost on many occasions, including at the multicellular boundary in the independent lineages giving rise to animals and plants.

Finally, in an effort to identify the origins of the exomer complex, we took advantage of the sensitivity afforded by HMM-based searching methods for all of the homology searches that we performed. In cases when exomer homologues were identified, we tallied the functional annotation of the next best-scoring, non-orthologous protein. In cases when no clear exomer candidate was retrieved (i.e. the top hit had a robust functional annotation as a different protein), we tallied that annotation. We were not able to find any evidence of specific homology between a ChAP and a particular protein, nor any for Chs5 (data not shown). We further performed HMMER searches into the meta-genomes of the Asgardarchaeota, the recently described most closely related archaeal lineage to eukaryotes with which homologues of several eukaryotic membrane trafficking machinery components are exclusively shared, implying the archaeal origin of this machinery²⁸. However, searches into the *Candidatus Thorarchaeota archaeon AB_25*, *Candidatus Heimdallarchaeota archaeon LC_2*, *Candidatus Odinararchaeota archaeon LCB_4* and *Candidatus Lokiarchaeota archaeon CR_4* genomes yielded no significant results that met the forward and reverse BLAST criteria set out in the Materials and Methods. Although the presence of BRCT domains and TPR repeats in Chs5 and ChAP proteins, respectively, are suggestive of origins from other eukaryotic proteins containing these domains, no clear hypothesis regarding the origins of exomer components is supported at this time.

Exomer complex validation outside *Saccharomyces* genus

Our informatics analyses strongly suggested the presence of an exomer complex at work along the whole Fungi lineage. In order to test this hypothesis, we heterologously expressed the N-terminal part of the Chs5 genes from several fungi including the basidiomycete *Ustilago maydis* and the zygomycete *Mucor circinelloides* in *S. cerevisiae* cells deleted for *CHS5*. Taking into account that the N-terminal part of Chs5 (ScChs5*) is functional²⁹, we amplified this fragment by PCR from *S. cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *U. maydis* and *M. circinelloides* (see Supplementary Fig. S1), cloned them, fused to a GFP-tag at their C-terminus, and expressed the resulting fusion proteins under the strong pGAL1 promoter in *S. cerevisiae*.

The localization of the proteins was assessed by fluorescence microscopy after one and three hours of expression (Fig. 5). The proteins ScChs5*, KlChs5* and CaChs5* were neatly visualized as intracellular spots after one hour, showing a strong co-localization with the TGN marker Sec7-mR2 (Table 1) suggestive of its correct assembly. Overexpression for three hours of both *U. maydis* and *M. circinelloides* Chs5 N-terminal fragments, lead to the formation of discrete intracellular foci that, however, did not co-localized with Sec7-mR2 (Fig. 5A), a result that question the nature of these foci.

Chs5 acts as scaffold for the ChAP subunits of exomer, therefore we next determined the capacity of these N-terminal fragments to recruit the Chs6 ChAP (Figure 5B). The ScChs5* and KlChs5* proteins co-localized neatly with Chs6-mCh after one hour in galactose in intracellular spots. However, co-localization between CaChs5* and Chs6 was almost negligible despite the correct localization of the CaChs5* at the TGN. Longer overexpression of this protein partially colocalized with Chs6 at an uncertain intracellular localization (not shown). The co-localization between UmChs5* or McChs5* and Chs6 is irrelevant since it would occur at an incorrect localization. Altogether, these results (Table 1) indicate that only the N-terminal fragments from Saccharomycotina strains assembled at the TGN and are able to recruit to some extent the Chs6 ChAP.

We next addressed the functional complementation of these proteins. Overexpression of ScChs5* complemented the *chs5Δ* associated phenotypes²⁹, Fig. 5B) including calcofluor resistance, and lithium and hygromycin sensitivities. The KlChs5* fragment had a modest effect on calcofluor sensitivity but clearly alleviated lithium and hygromycin sensitivities. CaChs5* improved lithium and hygromycin resistance while was unable to restore calcofluor sensitivity. UmChs5* ameliorated only the growth on lithium plates. McChs5* overexpression results are difficult to interpret because the deleterious effects on the construct upon overexpression (notice its low growth in control plates).

Table 1. Analysis of N-terminal fragments of Chs5 from different fungal origins expressed under *GAL1* promoter.

Protein	Intracellular spots after 1 or 3 hours expression	Co-Localization with Sec7-mR2 (%)	Co-Localization with Chs6-mCh (%)	Calcofluor sensitivity	LiCl sensitivity	Hygromycin sensitivity
ScChs5*	+++ ^(1h)	93.2±1 ^(1h)	90.1±6.2 ^(1h)	++	+	+++
KlChs5*	+++ ^(1h)	92.4±0.8 ^(1h)	52.6±7 ^(1h)	+	++	+++
CaChs5*	++ ^(1h)	91.0±0.8 ^(1h)	None ^(1h)	-	++	+++
UmChs5*	+ ^(3h)	< 10 ^(3h)	NA	-	++	-
McChs5*	+ ^(3h)	< 10 ^(3h)	NA	NA	NA	NA

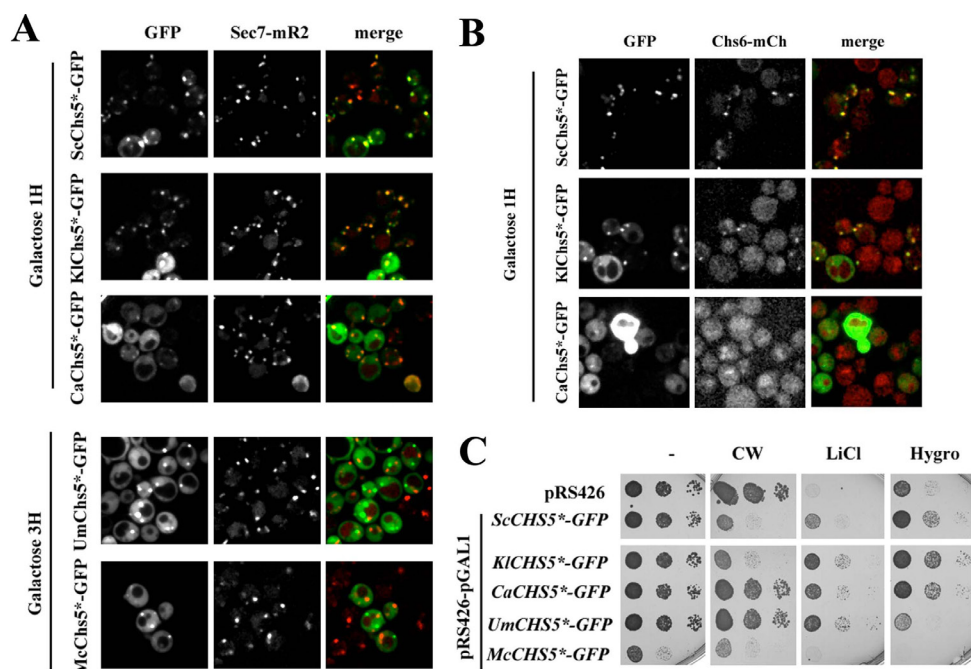


Figure 5. Heterologous expression of N-terminal fragments of *CHS5* with different evolutionary origins: *S. cerevisiae* (ScChs5*), *K. lactis* (KICHs5*), *C. albicans* (CaChs5*), *U. maydis* (UmChs5*) and *M. circinelloides* (McChs5*). (A) Localization of N-terminal fragments of Chs5 from the indicated proteins tagged with GFP and co-localization of these fragments with the TGN marker Sec7-mRuby2. Images were acquired after induction in galactose media for the indicated times. (B) Co-localization of heterologously expressed versions of Chs5 with the Chs6 ChAP. The plasmids containing the indicated version of Chs5* were transformed in a *S. cerevisiae chs5Δ* mutant with a chromosomally tagged version of *CHS6* (*CHS6*-mCherry). Proteins were expressed in galactose media for one hour as indicated. Note the apparent co-localization of green and red signals in some strains, indicative of an effective recruitment of Chs6-mCh from the cytoplasm by the heterologously expressed Chs5* fragments. (C) Complementation of the *chs5Δ* phenotypes by the heterologously expressed proteins. Note the alleviation of some phenotypes upon overexpression on galactose media. Overexpression of McChs5*-GFP showed deleterious effects on growth, therefore the complementation test is unreliable. All test were preformed in a *S. cerevisiae chs5Δ* strain grown overnight in raffinose media and later plated directly on galactose plates after appropriated dilution. See text and Table 1 for additional details on the interpretation of the figure.

In summary, most of the heterologously expressed N-terminal fragments of Chs5 were able to partially complement the *chs5Δ* associated phenotypes in *S. cerevisiae*. Although function likely diverges the most distantly related taxa are from *S. cerevisiae*, these data do suggest a role for the exomer complex within fungi.

Discussion

In *S. cerevisiae*, the exomer complex serves as a potential adaptor complex for the export of cargo from the TGN to the plasma membrane. In fact, there is no single exomer complex, but several different ones can be formed, presumably aiding the transport of specific cargoes. We sought to understand the extent to which this secretory pathway was present in eukaryotes beyond this model system, as well as to understand the evolutionary history of the complex.

We were able to confirm that the four proteins Bch1, Bch2, Chs6 and Bud7 are specific to the *Saccharomyces* (plus *C. glabrata*)¹⁰. These were produced by three gene duplications, two in the *Saccharomyces* (plus *C. glabrata*) and one after *Yarrowia* split from the remaining Saccharomycotina, producing a paralogous protein family from a single primordial ChAP protein. Notably, the phylogeny suggests that the duplication of the relevant paralogues took place prior to the separation of *C. glabrata* from the *Saccharomyces*. In this case, the *C. glabrata* Bud7 and Bch2 paralogues were subsequently lost. This would be consistent with the loss of new paralogues early after duplication and before neofunctionalization has been established. *C. glabrata*

has also been recently noted for its genomic plasticity³⁰ and so the loss of paralogues is not unreasonable.

The Chs5 protein was found to be present in all fungal genomes sampled except *E. cuniculi*, a member of the microsporidia that is well-established to have a reduced cellular configuration and genome complement^{31,32}, including the presence of a single AP complex³³. Based on the composition of the exomer complex as two Chs5 peptides and dimer of any of the four ChAP proteins, we speculate the presence of exomer-related pathways in all Fungi. This builds on earlier informatics work noting the presence of exomer subunits¹⁰, but refutes the idea that any given ChAP protein is the most ancient member of the family. Instead, our data is consistent with the initial duplication giving rise to the BB8 vs BC8 clade was the definitive event, with potential neofunctionalization occurring in the BC8 clade.

The analysis of sequence data clearly suggests an evolutionary conservation of the exomer machinery deep within the Fungi. However, the phenotypes associated to the absence of exomer are difficult to assess in fungi other than *S. cerevisiae*, since the exomer mutants of *U. maydis*, *C. albicans* or *S. pombe*^{18,34} did not show the phenotypes associated to the absence of exomer in *S. cerevisiae*³⁴, i.e. calcofluor resistance or alkali metal cation sensitivity. In order to solve this conundrum, we opted for the heterologous expression and characterization in *S. cerevisiae* of the orthologues of Chs5 from differently separated fungal lineages.

Our results indicate a limited capacity of the N-terminal fragments of Chs5 from different origins for their assembly in the cytosol of the yeast cells based on their intracellular localization, their ability to recruit the ChAP Chs6 and their capacity to complement some of the exomer functions in the *chs5Δ* mutant. The KIChs5* protein, like the original ScChs5*^{12,29}, seemed to be able to assemble a rather functional exomer in *S. cerevisiae* based on the complemented phenotypes, in clear agreement with the close evolutionary relationship between these two fungi. Apparently, the KICsh5* fragment can serve as an efficient scaffold for the recruitment of the multiple ChAPs present in *S. cerevisiae*. In contrast, as observed in the colocalization experiments with Chs6, CaChs5* is less efficient for the recruitment of the ChAPs, being unable to complement the calcofluor resistance of the *chs5Δ* mutant. This result is not surprising, considering that the involvement of exomer in chitin synthesis is a recent evolutionary acquisition within the *Saccharomyces* genus associated to the functional specialization of the Chs6 ChAP³⁴. Moreover, it will be fully coincident with the neofunctionalization occurring in the BC8 ChAP clade suggested by the bioinformatics analysis. However, we have not been able to show a functional conservation for Chs5 outside Saccharomycotina since UmChs5* and McChs5* did not assemble at the TGN and have not the ability to recruit Chs6. But, the capacity of UmChs5* to complement the lithium sensitivity of the exomer mutant would suggest a conserved capability that need to be confirmed with other methods.

A common trait for exomer cargoes appears to be the polarized localization at the plasma membrane¹⁷, which is maintained by a delicate balance of exo- and endocytosis requiring exomer being in control of TGN export. Overall, our data suggest functional homology of exomer proteins across Saccharomycotina, while also showing differences consistent with the wide evolutionary distance of the taxa in question that probably reflect also the progressive neofunctionalization of ChAPs in the BC8 clade that led to the unique exomer specialization as a cargo adaptor in *Saccharomyces*.

We were further able to identify orthologues of a ChAP protein in a wide-range of eukaryotic organisms. However, we were also frequently unable to identify a homologue, even when searching genomic contigs and using the closest related organism as a comparison database. It is important to acknowledge the caveats of negative data in studies such as these. Failure to identify an orthologue could be due to incomplete genomic databases, and/or divergence of the protein sequence beyond detection of the algorithms. For any given search, we are conservative in our statement of “not identified”, rather than the protein not being encoded. Nonetheless, in cases when no orthologues could be identified in coherent taxonomic blocks, despite our use of the most sensitive available sequence homology searching methods, some conclusions can be drawn.

The presence of a putative ChAP, in the apparent absence of its interacting partner Chs5, raises at least two functional possibilities. On the one hand, ChAP could be interacting with an analogous subunit. On the other hand, all of the ChAP subunits in yeast are known to bind the Arf GTPase directly^{10,12}. Arf is an ancient central component of the vesicle formation machinery³⁵. It is possible that ChAP acted in the LECA to mediate Arf function and retains that function in those eukaryotes that possess it today. Regardless of how ChAP functions, its presence and expression indicates an additional facet to the trafficking pathways of microbial eukaryotes with medical and global health relevance, such as *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis* and in protists with ecological importance such as ciliates and green algae.

This is particularly true of the Fungi. Given the environmental importance of Fungi in healthy ecosystems and bioremediation, the demonstration of an exomer-mediated secretory pathway gives insight into the cellular workings of a major contributor to our biosphere. While it had previously been reported that exomer subunits could not be found in the animal and plant genomes available at the time¹⁰, our results show this to be the case in a much wider sampling of those taxa, and more importantly show the presence of ChAP in their respective single celled-relatives, pin-pointing when the losses occurred and thus giving more confidence of true absence rather than failure to identify the orthologue. The extension of exomer as a feature of fungal cells, and not simply yeast, therefore has intriguing potential implications for new therapeutic avenues of

intervention for major crop and human pathogens.

The presence of ChAP orthologues in diverse eukaryotes means that this protein is ancient, likely present in the LECA, estimated at 1.5 billion years ago³⁶. This adds yet one more component to the growing list of trafficking factors present in this apparently sophisticated ancestor³⁷. The addition of the Chs5 protein in the Fungi then gave rise to what is considered the exomer pathway per se, which was elaborated by the gene duplications of the ChAP in the ascomycetes (Fig. 6). Intriguingly, the appearance of Chs5 in Fungi coincides with the time point at which the loss of AP4 is first inferred to have occurred³³. Though absent from many fungal lineages, subunits of AP4 have been identified in basidiomycete, glomeromycete and chytridiomycete lineages, which implies that AP4 was lost independently at least 8 times across Fungi³³. This pattern is consistent with a reduced role for the complex and thus a relaxed selection on its presence.

AP4 is known to mediate post-TGN trafficking and has been implicated in polarized cargo sorting in animal cells³⁸. Recent data suggests that AP4-mediated traffic proceeds via an endosomal intermediate before cargo reaches the surface^{39,40}. As exomer is also responsible for post-TGN trafficking, we propose that the evolution of an exomer complex introduced redundancy in the secretory pathway that resulted in some lineages in the degeneration and loss of AP4. Indeed, since the exomer pathway is more direct than the AP4 pathway³⁹, in cases where efficacy of the secretory route was selected, this could have facilitated AP4 loss. Intriguingly the glomeromycete *Rhizophagus irregularis* possesses both a complete AP4 tetramer and the Chs5+ChAP proteins, suggesting that the two pathways can be encoded in the same organismal genome concurrently.

At the same time our frequent failure to identify a ChAP orthologue, means inferred losses in several major lineages (Fig. 6). This makes ChAP yet another example of proteins with a ‘Patchy’ distribution, as has previously been reported for other vesicle coats (AP5, TSET), GTPases and regulators (ArfGAPC2, RabTitan)¹⁹. Many of these proteins, like ChAP, are present in the rest of eukaryotes but lost in animals, raising the important question of what additional cell biology exists in eukaryotes that we cannot study or detect by work in metazoan model organisms alone. New emerging model organisms from across eukaryotic diversity are becoming increasingly tractable and are yielding useful data on the cell biology of membrane trafficking⁴¹ and references there-in). Making better use of comparative cell biology in a representative sampling of eukaryotes should provide tremendous opportunities to explore the widespread features of the membrane trafficking system.

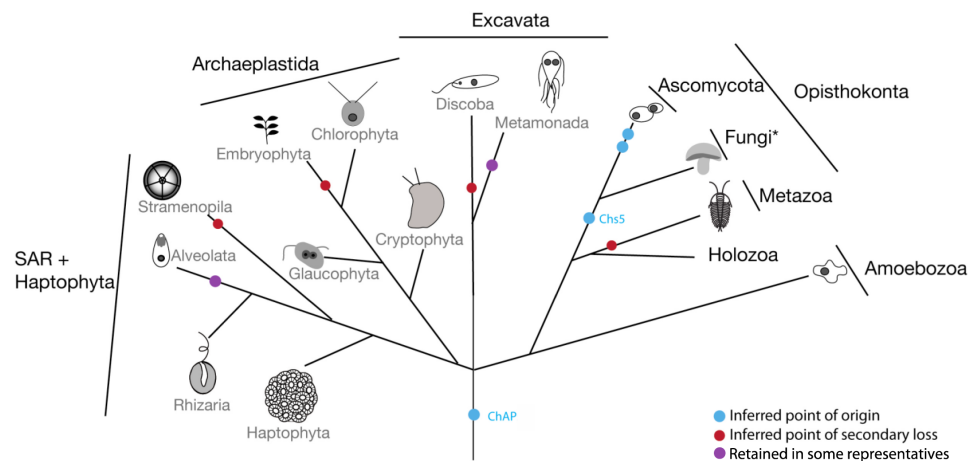


Figure 6. Exomer component evolution across the tree of eukaryotes. The gains and losses of exomer components are mapped on this cartoon representation of eukaryotic lineages based on presence of at least two positive orthologues in a given taxonomic group. The purple circles indicate two instances where a single representative taxon possesses the ChAP protein despite multiple other representatives lacking the gene. In both cases (*Toxoplasma gondii* and *Trichomonas vaginalis* respectively), the organisms in question are known possess more canonical or expanded eukaryotic complements and have retained aspects lost in their relatives^{54,55}. The double blue circle in the ascomycetes denotes the duplications giving rise to the expanded ChAPs complement, as detailed in figures 2 and 3. The Fungi* represents the paraphyletic assembly of Holomycota, with Ascomycota treated separately due to the additional evolutionary detail relating to exomer. Relationships are based on^{56–58}.

Methods

Homology Searching. Homology searches for exomer components were performed using BLAST and HMMER homology searching in a representative sampling of eukaryotic organisms with fully sequenced genomes. *S. cerevisiae* sequences for Chs5, and the ChAPs Bch1, Bch2, Bud7, and Chs6 were used as initial queries. See Supplementary Table S1 for a complete list of organisms examined and the accession numbers of all sequences identified. Initially, BLAST (2.2.29+)⁴² searches were undertaken, using a bi-directional best hit search strategy. Retrieved proteins were deemed as positive hits, only if they were retrieved by a *S. cerevisiae* query and also retrieved the *S. cerevisiae* sequence when used as a BLAST query. An E-value cutoff of 10-40 was applied for Chs5 BLAST searches, in order to reduce false-positives. An inclusive E-value of 0.05 was applied to searches for the ChAP proteins. In addition, BLAST hits were required to retrieve the *S. cerevisiae* query with an e-value at least two orders of magnitude lower than the next best non-redundant hit. BLAST hits that met these search criteria were further evaluated using multiple sequence alignment, and searches in the Pfam database⁴³, in order to confirm similarity of their domain structure to the query proteins. Several positive BLAST hits for the ChAP proteins were found to lack ChAPs domains using these approaches, and these sequences were eliminated from the dataset. Searches were also undertaken using HMMER (3.1b1)⁴⁴. Positive hits from the initial BLAST analysis were aligned using MUSCLE⁴⁵, and used to construct Hidden Markov Models (HMMs). Additional homologues identified using HMMER, were added to the HMMs for subsequent HMMER searches, until no more homologues were identified. In order to validate hits retrieved by HMMER, reverse BLAST searches were performed for each hit into the *S. cerevisiae* genome. HMMER hits were considered positive if the original *S. cerevisiae* query (or another ChAP homologue) was retrieved as the top hit in these BLAST searches. For candidate proteins that were pre-duplicates to the specific ChAP paralogues, retrieval of any ChAP query was the criteria, and then relationships were determined by phylogenetic analysis. To reduce the risk of false negatives due to divergence between candidate orthologues and *S. cerevisiae*, we performed the reverse BLAST analysis for all candidate orthologues, but into organismal databases of diverse taxa from which positive orthologues had been identified in initial rounds of homology searching. If a candidate protein retrieved the identified orthologue in that organism as the top hit using the above criteria, it was also deemed a homologue. Organismal genomes used as reverse BLAST databases included, *Dictyostelium discoideum*, *Dictyostelium fasciculatum*, *Bigeloviella natans*, *Salpingoeca rosetta*, *Tetrahymena thermophila*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Micromonas pusilla*, *Guillardia theta*, and *Trichomonas vaginalis*. To assess origins of the exomer components, HMMER search results for ChAPs and Chs5 were parsed for more distant homology to non-exomer components. The top non-orthologous retrieved protein, non-ChAP protein in the case of all ChAP components, was tallied for all searches and expressed as a percentage. HMM-HMM searching was done to look for homology between exomer components and other protein families. The HHpred server: <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred> was used with the following settings: Maximum of zero multiple sequence alignment generation steps (use just the input alignment), and search in all the alignment databases. The organisms for which comparisons were made were: *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Plasmodium falciparum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Ustilago maydis*.

Phylogenetics. Orthologues for ChAP proteins were aligned using MUSCLE v.3.8.31⁴⁵. Alignments were visualized using Mesquite v.2.75⁴⁶, adjusted by eye, and only regions of un-ambiguous homology were retained for phylogenetic analysis. All alignments are available upon request. An initial alignment of Fungal ChAP homologues of 30 taxa and 542 amino acid positions was analyzed (data not shown). A second data matrix, of 54 taxa and 395 AA positions, with several additional *Saccharomyces* species added and the *R. allomyces* sequence removed (due to its presenting a rapidly diverging sequence in the initial phylogeny) was analyzed. Bayesian phylogenetic analyses were performed using MrBayes v3.2.6⁴⁷ with the following parameters; prset aamodelpr = mixed; mcmcngen = 10,000,000; printfreq = 10000; samplefreq = 1000; nchains = 4. Maximum likelihood analyses were performed, using RAXML version 8.2.9⁴⁸ with the Protein GAMMA mod-el for rate heterogeneity and the LG4X substitution matrix, obtain the optimal ML topology and bootstrap support values. 100 bootstrap pseudo-replicates were used for each analysis. Bootstrap values ≥ 50 were considered significant. Analyses were run on the CIPRES server⁴⁹ and the resulting trees were visualized using FigTree v1.4.0.

Calculation of Percent Identities between Fungal ChAP sets. For all pairwise calculations, distance matrices were calculated using FastME V2.0 (50) from an untrimmed alignment (52 taxa and 1354 position). The percent ID for each pair of sequences between the two datasets being compared was calculated using a conversion of $(1 - (\text{uncorrected p-distance}) * 100)$. The average percent identity for comparisons between two taxon sets was calculated using the Average function in Excel and the error was calculated using the STDEV function. Note that due to potential that the *C. glabrata* sequences are in fact

preduplicates and phylogenetically misplaced or the alternate hypotheses that they are paralogues that have not neofunctionalized, allowing for the loss of the additional paralogue, these were treated within the preduplicate clades and not the *Saccharomyces*-specific ChAP clades of Bch1, Bch2, Chs6 and Bud7.

Characterization of heterologous proteins. N-terminal fragments of Chs5 from different origins (Supplementary Fig. S1) were amplified using PCR and synthetic hybrid nucleotides that directed both amplification and recombination with the appropriated regions of the GAL1 promoter and the GFP in the plasmid pRS426::pGAL1-*CaCHS7-GFP*⁵⁰. The *S. cerevisiae* (ScChs5*), *K. lactis* (KlChs5*), *C. albicans* (CaChs5*) and *U. maydis* (UmChs5*) fragments were amplified directly from the corresponding genomic DNA, but the *M. circinelloides* McChs5* fragment was amplified from a cDNA gene bank kindly provided by E. Iturriaga owing to the presence of introns in this region. Amplified fragments with the right size were later co-transformed into *S. cerevisiae* with plasmid pRS426::pGAL1-*CaCHS7-GFP* linearized with EcoRI and uracyl prototrophs colonies were selected. Plasmid DNA from several of these colonies was recovered in *E. coli*, characterized by endonuclease restriction and those showing the appropriated structure were later confirmed by direct sequencing. These plasmids were later transformed in the appropriated strains of *S. cerevisiae* for further experiments. Protein localization was assessed by fluorescence microscopy using an Olympus Spinning Disk system. Cells were grown O/N in SD-Ura raffinose medium and protein expression was later induced for different times by adding galactose up to 2%. Functionality of the heterologous expressed proteins was assessed in a *S. cerevisiae chs5Δ* mutant based on the *chs5Δ* phenotypes previously described¹⁷.

References:

1. Howell, G. J., Holloway, Z. G., Cobbold, C., Monaco, A. P. & Ponnambalam, S. Cell Biology of Membrane Trafficking in Human Disease. *International Review of Cytology* 252, 1–69 (2006).
2. Olkkonen, V. M. & Ikonen, E. When intracellular logistics fails--genetic defects in membrane trafficking. *J. Cell Sci.* 119, 5031–5045 (2006).
3. De Matteis, M. A. & Luini, A. Mendelian Disorders of Membrane Trafficking. *N. Engl. J. Med.* 365, 927–938 (2011).
4. Bonifacino, J. S. Vesicular transport earns a Nobel. *Trends in Cell Biology* 24, 3–5 (2014).
5. Stow, J. L. Nobel Prize discovery paves the way for immunological traffic. *Nature Reviews Immunology* 13, 839–841 (2013).
6. Hutagalung, A. H. & Novick, P. J. Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. *Physiol. Rev.* 91, 119–149 (2011).
7. Simpson, F., Peden, A. A., Christopoulou, L. & Robinson, M. S. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J. Cell Biol.* 137, 835–845 (1997).
8. Robinson, M. S. Adaptable adaptors for coated vesicles. *Trends in Cell Biology* 14, 167–174 (2004).
9. Spang, A. The road not taken: Less traveled roads from the TGN to the plasma membrane. *Membranes* 5, 84–98 (2015).
10. Trautwein, M. et al. Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* 25, 943–954 (2006).
11. Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. & Schekman, R. Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* 174, 973–983 (2006).
12. Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., Strassner, A. M. & Christopher Fromme, J. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* 31, 4191–4203 (2012).
13. Paczkowski, J. E. & Fromme, J. Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev. Cell* 30, 610–624 (2014).
14. Huranova, M., Muruganandam, G., Weiss, M. & Spang, A. Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep.* 17, 202–219 (2016).
15. Barfield, R. M., Fromme, J. C. & Schekman, R. The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* 20, 4985–4996 (2009).
16. Ritz, A., Trautwein, M., Grassinger, F. & Spang, A. The prion-like domain in the exomer-dependent cargo pin2 serves as a trans-golgi retention motif. *Cell Rep.* 7, 249–260 (2014).
17. Anton, C. et al. Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol. Biol. Cell* 28, 3672–3685 (2017).
18. Hoya, M. et al. Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics* 205, 673–690 (2017).
19. Schlacht, A., Herman, E. K., Klute, M. J., Field, M. C. & Dacks, J. B. Missing pieces of an ancient puzzle: Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, (2014).

20. Dacks, J. B., Poon, P. P. & Field, M. C. Phylogeny of endocytic components yields insight into the process of nonendosymbiotic organelle evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, (2008).
21. Field, M. C. & Dacks, J. B. First and last ancestors: reconstructing evolution of the endomembrane system with ESCRTs, vesicle coat proteins, and nuclear pore complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, (2009).
22. Hirst, J. et al. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol.* 9, e1001170 (2011).
23. Hirst, J. et al. Characterization of TSET, an ancient and widespread membrane trafficking complex. *Elife* 2014, 1–18 (2014).
24. Dell'Angelica, E. C. et al. GGAs: A family of ADP ribosylation factor-binding proteins related to adaptors and associated with the Golgi complex. *J. Cell Biol.* 149, 81–93 (2000).
25. Martina, J. A., Bonangelino, C. J., Aguilar, R. C. & Bonifacino, J. S. Stonin 2: An adaptor-like protein that interacts with components of the endocytic machinery. *J. Cell Biol.* 153, 1111–1120 (2001).
26. Boehm, M. & Bonifacino, J. S. Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 12, 2907–2920 (2001).
27. Lynch, M., O'Hely, M., Walsh, B. & Force, A. The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate. *Genetics* 159, 1789–1804 (2001).
28. Zaremba-Niedzwiedzka, K. et al. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541, 353–358 (2017).
29. Martín-García, R. et al. The FN3 and BRCT motifs in the exomer component Chs5p define a conserved module that is necessary and sufficient for its function. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 2907–2917 (2011).
30. Ahmad, K. M. et al. Genome structure and dynamics of the yeast pathogen *Candida glabrata*. *FEMS Yeast Res.* 14, 529–535 (2014).
31. Katinka, M. D. et al. Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453 (2001).
32. Miranda-Saavedra, D. et al. The complement of protein kinases of the microsporidium *Encephalitozoon cuniculi* in relation to those of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *BMC Genomics* 8, 309 (2007).
33. Barlow, L. D., Dacks, J. B. & Wideman, J. G. From all to (nearly) none: Tracing adaptin evolution in Fungi. *Cell. Logist.* 4, e28114 (2014).
34. Anton, C., Valdez Taubas, J. & Roncero, C. The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi. *Genetics* genetics.300767.2018 (2018). doi:10.1534/genetics.118.300767
35. Li, Y. et al. Functional genomic analysis of the ADP-ribosylation factor family of GTPases: phylogeny among diverse eukaryotes and function in *C. elegans*. *FASEB J.* 18, 1834–1850 (2004).
36. Eme, L., Sharpe, S. C., Brown, M. W. & Roger, A. J. On the Age of Eukaryotes: Evaluating Evidence from Fossils and Molecular Clocks. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, (2014).
37. Koumandou, V. L. et al. Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 48, (2013).
38. Simmen, T., Höning, S., Icking, A., Tikkanen, R. & Hunziker, W. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat. Cell Biol.* 4, 154–159 (2002).
39. Toh, W. H., Tan, J. Z. A., Zulkefli, K. L., Houghton, F. J. & Gleeson, P. A. Amyloid precursor protein traffics from the Golgi directly to early endosomes in an Arl5b- and AP4-dependent pathway. *Traffic* 18, 159–175 (2017).
40. Mattera, R., Park, S. Y., De Pace, R., Guardia, C. M. & Bonifacino, J. S. AP-4 mediates export of ATG9A from the trans-Golgi network to promote autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Dec 12;114, 201717327 (2017).
41. Klinger, C. M. et al. Resolving the homology-function relationship through comparative genomics of membrane-trafficking machinery and parasite cell biology. *Mol. Biochem. Parasitol.* (2016). doi:10.1016/j.molbiopara.2016.07.003
42. Altschul, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402 (1997).
43. Finn, R. D. et al. Pfam: The protein families database. *Nucleic Acids Research* 42, (2014).
44. Eddy, S. R. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* 14, 755–763 (1998).
45. Edgar, R. C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113 (2004).
46. Maddison, W. P. & Maddison, D. R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.75. 2011. URL <http://mesquiteproject.org> (2015).
47. Ronquist, F. & Huelsenbeck, J. P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574 (2003).
48. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30, 1312–3 (2014).
49. Miller, M. A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for Inference of Large Phylogenetic Trees. in *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE) 2010* 1–8 (2010).

50. Sanz, M. et al. *Candida albicans* strains deficient in CHS7, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* 151, 2623–2636 (2005).
51. Diezmann, S., Cox, C. J., Schönian, G., Vilgalys, R. J. & Mitchell, T. G. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: A multigenic analysis. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5624–5635 (2004).
52. James, T. Y. et al. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443, 818–822 (2006).
53. Derelle, R. et al. Bacterial proteins pinpoint a single eukaryotic root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E693-9 (2015).
54. Carlton, J. M. et al. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* (80-.). 315, (2007).
55. Woo, Y. H. et al. Chromerid genomes reveal the evolutionary path from photosynthetic algae to obligate intracellular parasites. *Elife* 4, (2015).
56. Adl, S. M. et al. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429–493 (2012).
57. Brown, M. W. et al. Phylogenomics demonstrates that breviate flagellates are related to opisthokonts and apusomonads. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 280, 20131755 (2013).
58. Burki, F. et al. Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152802 (2016).

Acknowledgements

We wish to thank B. Jiang, Dept of Mathematics & Statistical Sciences, UAlberta for advice on biostatistics and members of the Dacks for helpful discussion. A cDNA library of *M. circillenioides* was kindly provided by E. Iturriaga. CA is supported by a USAL predoctoral fellowship. Work in the CR laboratory was supported by grants BFU2013-48582-C2-1-P and BFU2017-84508-P from the CICYT/FEDER Spanish program. Work in the Spang lab is supported by the University of Basel and the Swiss National Science Foundation (310030B_163480). Work in the Dacks lab is funded by a Discovery Grant (RES0021028) from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada. JBD is the Canada Research Chair (Tier II) in Evolutionary Cell Biology.

Author Contributions

AS and JBD conceived of the project. JBD, AS and CR designed and guided the work. LDB, JBD and IRM executed the informatic analyses. CA executed the molecular cell biological analyses. IRM, JBD and CR wrote the manuscript. All authors edited the manuscript.

Competing Interests: The authors declare that there are no competing interests.

CAPÍTULO 3:

El exómero en el metabolismo del nitrógeno

En este capítulo, a diferencia de los dos anteriores, se expondrán resultados no publicados obtenidos en el desarrollo de la tesis, todos ellos concernientes a la posible implicación del exómero en la función nutricional celular. Asimismo, para simplificar la memoria, no existirá un apartado exclusivo de materiales y métodos sino que aquellos elementos usados exclusivamente en este capítulo serán detallados en el texto. Además, la información relativa a las cepas, plásmidos y protocolos de extracción y detección proteica específicos de este capítulo serán detallados en los pies de figura o en las **tablas 1, 2 y 3**. Para aquellos materiales y métodos que no se especifiquen en el texto, acudir a los materiales y métodos descritos en los dos capítulos anteriores.

1. Antecedentes

En diferentes estudios publicados previamente al desarrollo de esta tesis, se describe someramente la sensibilidad o resistencia del mutante del exómero *chs5Δ* a compuestos previamente relacionados con la función nutricional celular. Tal es el caso de la hipersensibilidad descrita para este mutante al sulfato amónico (Trautwein et al., 2006) o a la rapamicina (Dudley et al., 2005), una droga capaz de unirse y bloquear al regulador nutricional TORC1. Como se describe en la introducción, el complejo TORC1 es clave en la función nutricional. Así, cuando la concentración intracelular de aminoácidos (aa') es óptima, el complejo EGO (‘Exit from rapamycin-induced GO arrest complex’) activará TORC1 que, a través de diferentes efectores, estimulará los procesos anabólicos como la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, al mismo tiempo que reprimirá los procesos catabólicos, ambos procesos con el fin último de promover el crecimiento celular. Cuando los niveles de aa' decaen, igual que ocurre cuando se añade rapamicina, se reprime el complejo TORC1, lo cual produce un bloqueo del crecimiento celular y se facilita la producción de proteínas implicadas en la toma de nutrientes (González and Hall, 2017; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012; Zhang et al., 2018). Por lo tanto, estas hipersensibilidades de los mutantes relacionaban al exómero con el metabolismo del nitrógeno, aunque ningún estudio ahondaba en las causas moleculares de estos fenotipos. Así, decidimos profundizar en el posible papel del exómero en dicho metabolismo.

2. El mutante del exómero *chs5Δ* es hipersensible al catión amonio

Al inicio de esta tesis y como un fenotipo más del exómero, se decidió explorar la hipersensibilidad del mutante *chs5Δ* al sulfato amónico. A lo largo de esta tesis, como se irá describiendo en el capítulo, dicho fenotipo se alejará del marco del balance catiónico, a favor de un papel del exómero en la función nutricional, sin perder de vista la fuerte conexión que hay entre ambas regulaciones.

El sulfato amónico es una sal, que disuelta en agua genera los iones amonio y sulfato. Así, en primer lugar quisimos discernir a que ion se debía esta hipersensibilidad. Vimos que dicha sensibilidad se debe al catión amonio, ya que el cloruro de amonio, respetando la molaridad, tiene un efecto similar al sulfato amónico (**Figura C3.1A**). El catión NH_4^+ , en cuanto a su estructura y carga es muy similar al catión K^+ , elemento vital para el mantenimiento de la homeostasis catiónica en *S. cerevisiae*. Debido a esa semejanza, se ha postulado que este ion es capaz de entrar en la célula inespecíficamente a través de los canales de potasio (Trk1/2). Así, en medios donde la concentración de amonio es muy superior a la de potasio, este catión podría entrar en la célula acumulándose en el interior, lugar donde podría suplantar al potasio en sus funciones de cofactor, impidiendo en definitiva el crecimiento celular (Hess et al., 2006). Teniendo en cuenta que los mutantes del exómero presentan hipersensibilidad a cationes tóxicos debido a un problema en la polarización y cantidad de la bomba

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ena1 (Anton et al., 2017), es posible que el origen de la hipersensibilidad al amonio sea el mismo. Sin embargo, como se describió, la sobreexpresión de dicho canal en el mutante no corrige la sensibilidad al amonio. Y además, la pequeña sensibilidad al amonio que presenta el mutante de los canales Ena (*ena1-4Δ*) se corrige con la adición de cloruro potásico al medio, no así para el caso del mutante del exómero (**Figura C3.1A**). Del resto de canales analizados, solo la sobreexpresión de Qdr2 revertía la sensibilidad al amonio del mutante del exómero. Pero este efecto, probablemente se deba a la capacidad que presenta Qdr2 expulsando inespecíficamente varios iones incluido el amonio (Anton et al., 2017). Parece por tanto, que la sensibilidad al amonio del mutante *chs5Δ* no estaría relacionada con el funcionamiento de las principales bombas y canales iónicos.

Como se hizo con otros fenotipos del exómero, se analizó la sensibilidad al amonio de cada una de las deleciones individuales y dobles de los ChAPs del exómero. Solo la deleción conjunta de las subunidades *BCH1* y *BUD7* presenta un fenotipo de hipersensibilidad al amonio (**Figura C3.1A y 1B**).

Como se describió en la introducción, otra señal de identidad del complejo del exómero es su relación con el complejo adaptador AP-1. Así, los cargos transportados por el exómero, Chs3 y Pin2, presentan una región de interacción con AP-1 que permite la retención del cargo en la red *trans*-Golgi (TGN)/endosomas tempranos (EE). En ausencia del exómero, estos cargos son bloqueados en esta región. Sin embargo, si además eliminamos cualquiera de las subunidades del complejo AP-1,

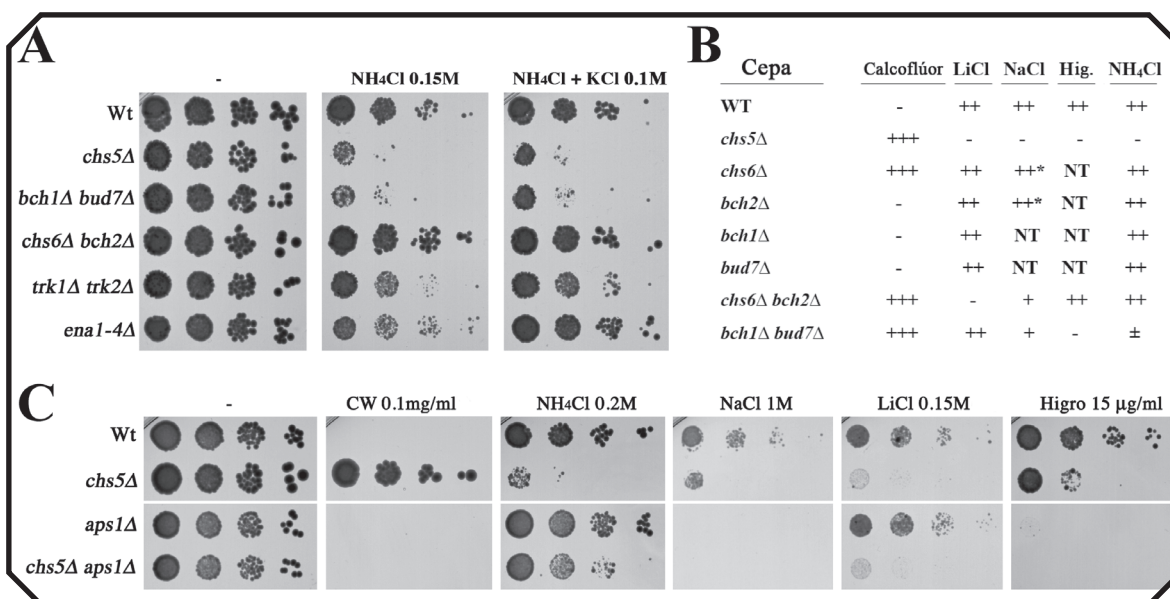


Figura C3.1. Sensibilidad al amonio de los mutantes del exómero. Todas las cepas están construidas en el fondo genético W303-1A. Las células incubadas en el medio YEPD se recogieron en fase logarítmica y se ajustaron en un mililitro de agua a DO600 1. Se hicieron diluciones 1/10 seriadas y con un replicador estéril se depositaron las gotas sobre las placas (Trilla et al., 1999). **A**) Comparación de la sensibilidad al cloruro de amonio y recuperación con cloruro potásico de los mutantes del exómero y los mutantes de los principales canales catiónicos. **B**) Tabla resumen de los fenotipos de los mutantes simples y dobles del exómero, incluyendo la sensibilidad al amonio (Anton et al., 2018). Los signos +/- indican el crecimiento de la cepa. *, datos de (Trautwein et al., 2006); NT, no testado. **C**) Efecto de la deleción conjunta del exómero y del complejo AP-1 en los fenotipos descritos para el mutante del exómero (*APS1* es la subunidad sigma del complejo AP-1). Nótese que la sensibilidad al amonio se comporta de un modo similar a la sensibilidad al CW, recuperándose el fenotipo silvestre al eliminar ambos complejos. Hig./Higo., Higromicina; CW, calcoflúor.

se elimina esta retención y el cargo es capaz de alcanzar la membrana plasmática (PM), aunque de forma menos polarizada (Anton et al., 2018; Ritz et al., 2014; Starr et al., 2012; Valdivia et al., 2002). En este sentido, a pesar de carecer de un cargo que explique esta sensibilidad al amonio, quisimos ver si la sensibilidad al amonio del mutante *chs5Δ* se revertía delecionando la subunidad menor del complejo AP-1 (*aps1Δ*). Como se puede ver en la **Figura C3.1C**, de forma similar a lo que ocurre para el fenotipo de resistencia a calcoflúor, cuando además de eliminar el exómero eliminamos el complejo AP-1 (*chs5Δ aps1Δ*), la sensibilidad al amonio se revierte. Así, a diferencia de las sensibilidades que presentan los mutantes del exómero a otros cationes tóxicos como el litio, sodio o higromicina, la sensibilidad del mutante del exómero al amonio podría estar ligada al fallo en el transporte de una proteína que interaccione a su vez con el complejo adaptador AP-1, tal y como se ha descrito para el cargo del exómero Chs3. Por lo tanto, esta evidencia respalda la existencia de un nuevo cargo del exómero. La supuesta proteína, quedaría retenida en ausencia del exómero en el TGN/EE gracias a su interacción con AP-1, dando lugar a esta sensibilidad al amonio. Y la eliminación conjunta de exómero y AP-1, permitiría a la proteína recuperar su localización en la MP a través de una ruta alternativa, revirtiéndose la sensibilidad.

3. La sensibilidad de los mutantes del exómero al amonio está ligada al metabolismo del triptófano

Durante un tiempo en el transcurso de esta tesis, el fenotipo de hipersensibilidad al amonio constituyó un ejemplo más del fallo en el balance catiónico presente en los mutantes del exómero. Sin embargo, en un ejemplo científico de serendipia, intentado analizar la posible relación del complejo AP-1 con el fenotipo de hipersensibilidad al amonio del exómero, vimos que la hipersensibilidad a dicho catión estaba relacionada con el fondo genético, es decir, solo se presentaba en algunas cepas de *S. cerevisiae* con una particularidad genética. En concreto, dicha particularidad es una mutación en el gen *TRP1*, gen que codifica para la fosforribosil antranilato isomerasa; enzima que cataliza el tercer paso para la síntesis de triptófano. De este modo, el mutante *chs5Δ* y el mutante doble *bch1Δ bud7Δ* generados en los fondos genéticos con dicha mutación, como son W303 o YPH499, presentan sensibilidad al amonio (**Figura C3.2A**) (Trautwein et al., 2006), no así los mutantes del exómero generados en fondos genéticos protótrofos para el triptófano, como X2180 o BY4741 (**Figura C3.2A**) (información acerca de los fondos genéticos en el pie de **Figura C3.2**). Para confirmar que esta sensibilidad se debía a la incapacidad de sintetizar triptófano y no a otro factor indeterminado presente en los fondos genéticos W303 o YPH499, decidimos complementar la auxotrofia del triptófano en el fondo genético W303 con un plásmido centromérico que expresa el gen *TRP1* bajo su propio promotor. Como se observa, la complementación del gen *TRP1*, y no la de otros genes metabólicos que también presenta inactivados este fondo genético (*HIS1*, *LEU2* o *URA3*), hace al mutante *chs5Δ* insensible al amonio (**Figura C3.2B**). Además, la adición de triptófano al medio también revierte la sensibilidad al amonio que presentaba el mutante *chs5Δ* (**Figura C3.2B**). Por lo tanto, la hipersensibilidad al amonio de los mutantes del exómero estaría relacionada con un problema en el metabolismo del triptófano.

A continuación, nos preguntamos si seríamos capaces de ver este defecto sin necesidad de aplicar un estrés por amonio. Para ello, extendimos cada cultivo en una placa Petri y cuantificamos semi-automáticamente el tamaño promedio de las colonias con ayuda de un macro desarrollado en ImageJ (**Macro 1**). Con esta aproximación observamos que en un medio sintético definido completo,

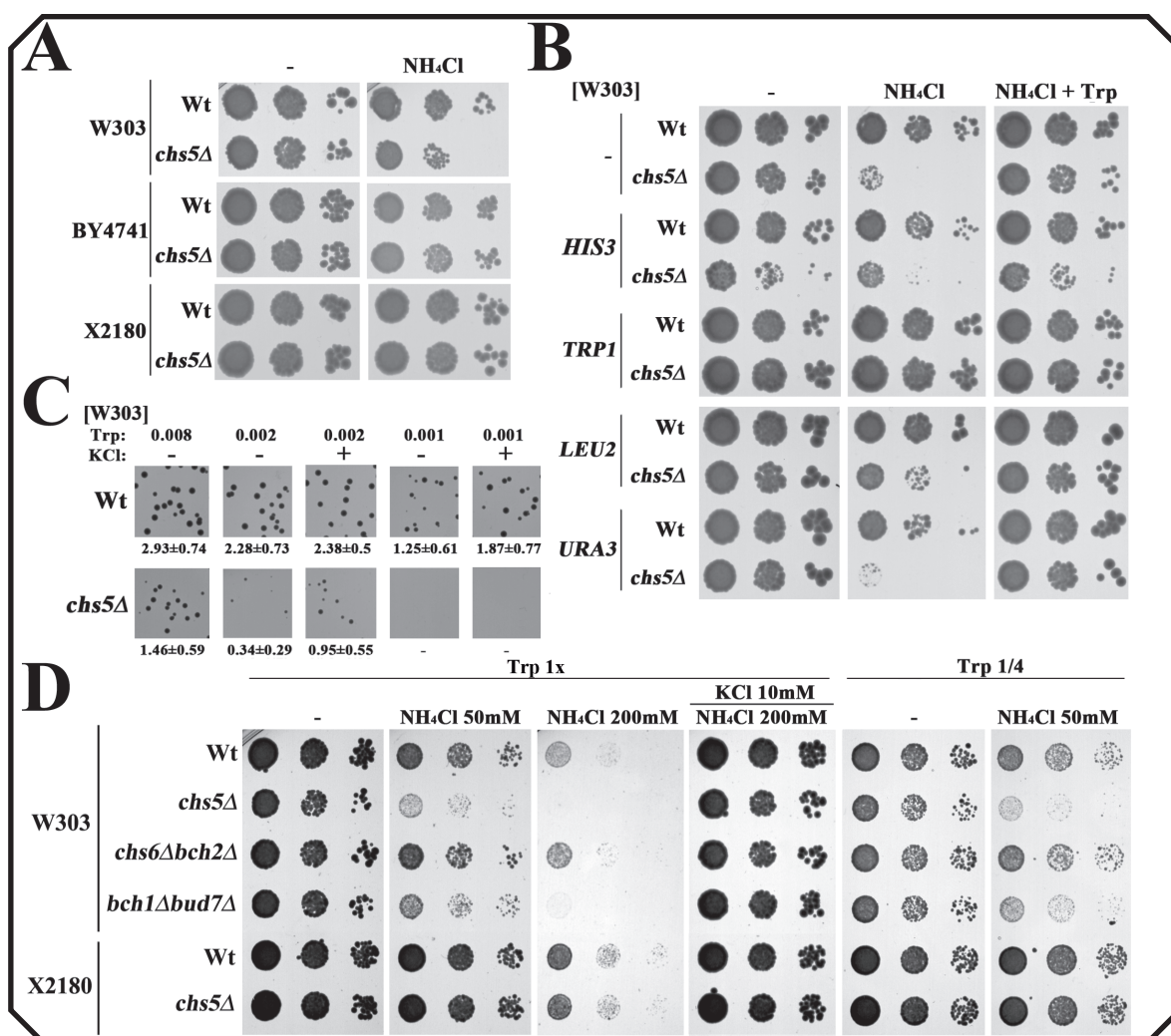


Figura C3.2. Conexión entre la sensibilidad al amonio y el metabolismo del triptófano. Fondos genéticos utilizados: **W303-1A**: MATa, *leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*. **BY4741**: MATa, *his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*. **X2180-1A**: MATa, *SUC2 mal mel gal2 CUP1*. Ensayos de gota (**A**, **B** y **D**) desarrollados del mismo modo que en la figura C3.1. Salvo especificación, concentración final de NH₄Cl 0,2 M y KCl 0,1 M. **A**) Comparativa de la sensibilidad al amonio de los mutantes *chs5Δ* generados en diferentes fondos genéticos en un medio YEPD. Nota: ambas cepas BY4741 carecen del gen *CHS3* (Wt = CRM1435, *chs5Δ*= CRM2453), esto no influye en la sensibilidad al amonio. **B**) Reversión del fenotipo de sensibilidad al amonio en el fondo genético W303 mediante la expresión del gen *TRP1* o la adición de triptófano en exceso (0.02 %). Los genes indicados fueron expresados bajo el control de su propio promotor en plásmidos centroméricos (**Tabla 2**). El crecimiento previo a la deposición de las gotas se realizó en medio SDc menos el correspondiente aminoácido para evitar la posible pérdida del plásmido, luego fueron inoculadas todas en la misma placa de YEPD. **C**) Tamaño de colonia en un medio SDc regulando la concentración final de triptófano (indicada en porcentaje). Cada experimento se realizó en placas de la misma procedencia. El dato numérico se corresponde con el diámetro promedio ± desviación estándar, y se midió en ImageJ con el **Macro 1**. Nótese el efecto leve que supone la adición de KCl. **D**) Sensibilidad al amonio en un medio definido completo con bajo contenido en potasio ('Translucent K⁺ free medium', (<http://www.formedium.com>)). Nótese que el efecto tóxico del amonio desaparece cuando hay un exceso de potasio. Trp 1x, 0.002 %; Trp ¼, 0.0005 %.

el mutante *chs5Δ* presentaba un tamaño de colonia inferior con respecto a la cepa silvestre (Wt). Además, la diferencia se acentuaba si reducíamos los niveles de triptófano, llegando a la inviabilidad del mutante cuando la concentración de triptófano es igual o inferior a 0.001% (**Figura C3.2C**). En

estas condiciones, la adición de potasio mejora levemente el tamaño de las colonias en todas las cepas, pero nunca rescata la diferencia entre la cepa control y el mutante.

La sensibilidad al amonio en *S. cerevisiae* ya había sido descrita, sin embargo, en contraposición a lo visto en los mutantes del exómero, esta se describió como una sensibilidad virtualmente común a las cepas silvestres de todos los fondos genéticos de *S. cerevisiae* y, además, parecía tener lugar exclusivamente en medios con baja concentración de potasio (Hess et al., 2006). Los medios comúnmente usados para el cultivo de *S. cerevisiae* (YEPD o SD, este último a base de YNb) presentan unos niveles de potasio muy superiores a los medios en los que suelen encontrarse las cepas silvestres del género *Saccharomyces* en la naturaleza. Así, para poder analizar mejor esta toxicidad del amonio decidimos usar un medio con una concentración de potasio y amonio reducida. El medio 'Translucent K⁺ free medium' presenta una concentración de potasio inferior a 1 mM y de 18,5 mM de amonio. Al igual que en un medio sintético definido común completo (SDc), se añadieron los suplementos de aa' necesarios para suplir las auxotrofías del fondo genético W303. Modificando los niveles de amonio, potasio y triptófano, se puede observar lo siguiente: Primero, el fondo genético W303 es hipersensible al amonio, probablemente porque el exceso de amonio intracelular y/o la respuesta para reducir sus niveles alteren la toma de aa', imprescindible para las cepas W303, no así para la cepa X2180 que es capaz de sintetizar todos los aa' a partir del amonio. Segundo, como vimos anteriormente, los mutantes del exómero del fondo genético W303 son claramente hipersensibles al amonio con respecto a la cepa silvestre, por el contrario, el mutante del exómero del fondo X2180 presenta solo una leve hipersensibilidad. Tercero, la reducción de la concentración de triptófano en el medio supone un incremento en la sensibilidad al amonio en todas las cepas. Y cuarto, la sensibilidad al amonio de todas las cepas analizadas en estas condiciones desaparece con la adición moderada de potasio, ya que a esta concentración de potasio, el amonio entra en menor proporción en la célula por los canales de potasio, y por lo tanto no existe un efecto tóxico (**Figura C3.2D**).

Estos datos relativos a la sensibilidad al amonio de los mutantes del exómero señalaban un problema en el transporte y/o almacenamiento de triptófano, y probablemente de otros aa', en estas cepas. Sin embargo, en condiciones de laboratorio, este problema en el metabolismo del triptófano parece ser relevante solo en aquellas cepas incapaces de sintetizar el triptófano, lo que no eximiría para que en determinadas condiciones, aún no identificadas, todas las cepas de *S. cerevisiae* carentes del exómero tengan una competitividad reducida fruto de un problema en el transporte y/o almacenamiento de aa'.

4. El exómero participa en el metabolismo de aminoácidos

Una vez ha quedado patente la implicación del exómero en el metabolismo del triptófano, quisimos analizar el metabolismo general de aa'. En primer lugar analizamos la sensibilidad del mutante *chs5Δ* a diferentes aminoácidos y análogos tóxicos. Una alteración en la sensibilidad a estos compuestos podría señalar un problema de transporte de los mismos, situación a priori plausible, ya que el exómero se ha visto implicado en el transporte de varias proteínas transmembrana, las cuales presentan una estructura secundaria similar a las permeasas de aa' (Anton et al., 2017). Con la idea de simplificar el análisis de los resultados, decidimos analizar estos compuestos en las cepas X2180-1A, ya que son capaces de sintetizar todos los aa', evitando así posibles interferencias fruto de la adición externa de aa' para cubrir auxotrofías.

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Así, analizamos la sensibilidad a diferentes compuestos que penetran en la célula a través de las permeasas de aa': un exceso de histidina, aminoácido que en concentración excesiva es capaz de bloquear metabólicamente el crecimiento celular (Ljungdahl et al., 1992); el aminotriazol o amitrol (3-AT), un análogo tóxico de precursores de aa' capaz de bloquear la ruta de síntesis de la histidina (Kanazawa et al., 1988); el L-azetidina-2-carboxilato (AzC), análogo tóxico de la prolina (WADA et al., 2008); el sulfometurón metil, un análogo bloqueante de la síntesis de valina e isoleucina (Falco and Dumas, 1985); y la canavanina, análogo tóxico de la arginina (Larimer et al., 1978). Como se muestra, en un medio con una fuente preferente de nitrógeno como es el amonio, el mutante del exómero *chs5Δ* presenta hipersensibilidad a la canavanina y es resistente al AzC, al 3-AT y al exceso de histidina; mientras que es igual de sensible al sulfometurón metil que la cepa control (**Figura C3.3A**). Este perfil de sensibilidad es complejo, y es difícil concluir cual puede ser el transportador de aa' afectado. Sin embargo, estos resultados refuerzan la idea de que el mutante del exómero presenta defectos en el transporte de aa' que van más allá de una deficiente asimilación del triptófano.

Aunque no podemos rechazar que la ausencia del exómero tenga un efecto en la expresión génica, pensamos que la explicación más lógica para estos resultados sería la implicación de este complejo en la localización y correcta función de algún complejo proteico capaz de orquestar la

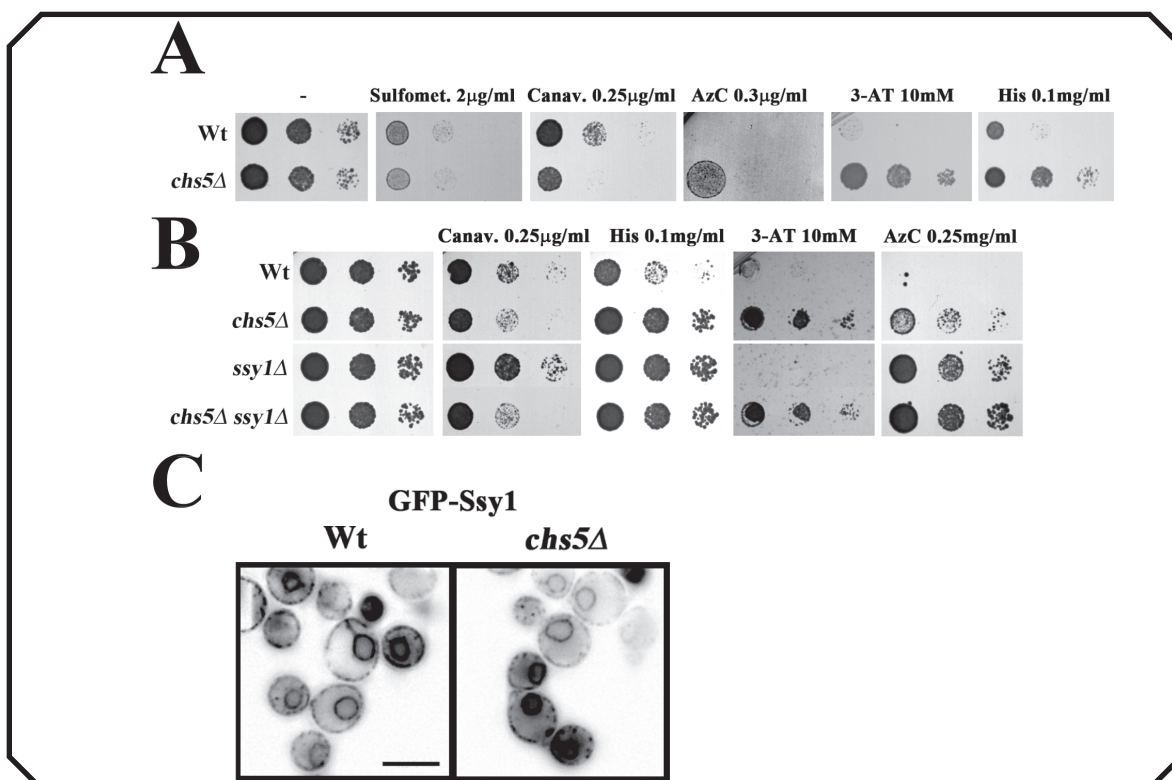


Figura C3.3. El exómero en el metabolismo general de aminoácidos. Los ensayos de gota (**A** y **B**) se realizaron con cepas X2180-1A, del mismo modo que en la **figura C3.1**, y depositados en medio YNB sin aa' (Dextrosa 2%, YNB sin aminoácidos Difco 0,7%) suplementados con el aa o análogo tóxico indicado. Sulfomet., sulfometurón metil; Canav., L-canavanina; AzC, L-azetidina-2-carboxilato; 3-AT, 3-aminotriazol; His, L-histidina (Sigma-Aldrich). **C**) Localización de Ssy1 (sensor SPS) con etiqueta GFP en el extremo N-terminal bajo el control del promotor PGAL1. Inóculo y crecimiento hasta fase exponencial en un medio sintético completo con rafinosa como fuente de carbono. Visualización al cabo de 1 hora de inducción en galactosa al 2% + 1 hora de represión por adición de glucosa al 2%. Barra de escala de 5 μm.

función de varias permeasas, como es el caso del complejo sensor SPS (Conrad et al., 2014; Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Así, comparamos los perfiles de sensibilidad del mutante *chs5Δ* y *ssy1Δ*, proteína principal del sensor SPS, así como el mutante doble *chs5Δ ssy1Δ* (**Figura C3.3B**). Al comparar las distintas cepas, se observa que los mutantes simples comparten parcialmente la resistencia a histidina y AzC, siendo el mutante *ssy1Δ* más resistente, mientras que sus fenotipos son inversos en el caso de la sensibilidad a la canavanina y al 3-AT. Con el fin de profundizar en la posible relación entre exómero y el sensor SPS, analizamos también la localización de Ssy1. En la cepa silvestre, la proteína está embebida en la membrana del RE cortical y contacta con la MP en las ‘contact junctions’. El tercio N-terminal, vital para su función sensora, toma una conformación capaz de proyectarse más de 30 nm hasta contactar con la MP mediante un dominio PMB (‘Plasma Membrane Binding’) (Kralt et al., 2015). Aunque no existen evidencias de un papel del exómero en el RE, de una forma indirecta pudiera modular la localización final del sensor. Sin embargo, el análisis de localización por microscopía no reveló diferencias significativas en la localización de Ssy1 entre el mutante y el control (**Figura C3.3C**). Por lo tanto, en ausencia de un análisis más detallado, la clave de los fenotipos del mutante del exómero no parece estar en una alteración en la localización del sensor SPS.

5. Papel del exómero en el tráfico intracelular de las permeasas de aminoácidos.

Una vez descartado un problema de transporte del sensor SPS como origen de los fenotipos descritos, decidimos analizar el comportamiento de las permeasas de aa’ ya que un fallo en el transporte de varias permeasas pudiera explicar el perfil de sensibilidad descrito anteriormente para el mutante *chs5Δ*. Nos centramos inicialmente en analizar los transportadores que median la entrada de triptófano, la permeasa general de aa’ Gap1, capaz de introducir todos los aa’ proteinógenos, y la permeasa específica de triptófano Tat2 (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). La proteína Gap1-GFP, al ser una proteína fuertemente regulada por la fuente de nitrógeno, fue expresada de forma regulada bajo el control del promotor PGAL1 en un medio definido con prolina, una fuente de nitrógeno no preferente, evitando así la degradación de Gap1 que induce la NCR en presencia de una fuente preferente como el amonio. La expresión de Gap1-GFP se indujo en galactosa al 2% y la represión se obtuvo añadiendo glucosa al 2% (Merhi and Andre, 2012). La expresión de Tat2 en cambio no está regulada por fuente de nitrógeno, por lo que su comportamiento se analizó directamente en una cepa con la proteína endógena marcada con GFP y crecida en medios SDc y YEPD.

Después de 2 horas de inducción la proteína Gap1-GFP se localiza en la MP de forma polarizada hacia la yema. Sin embargo, la cantidad de proteína que llega a la MP en el mutante *chs5Δ* es mucho menor, incrementándose su acumulación en puntos intracelulares (**Figura C3.4A**). Aunque esta localización alterada de Gap1 puede afectar al transporte general de aa’ en la célula, no puede explicar la deficiencia en la toma de triptófano ya que ésta se manifiesta en medios ricos en amonio, donde los niveles de Gap1 son despreciables debido a la NCR (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

Por el contrario, Tat2-GFP se localiza normalmente en la MP en ambas cepas tanto en SDc como en YEPD. Sin embargo, la localización vacuolar de Tat2-GFP en el mutante está reducida (**Figura C3.4B**) y los niveles totales de la proteína son más altos en los análisis de ‘western blot’ (**Figura C3.4C**), por lo que parecería claro que el tráfico de Tat2-GFP hacia la vacuola está significativamente reducido en el mutante *chs5Δ*. Este incremento en los niveles de Tat2 iría en principio en contra

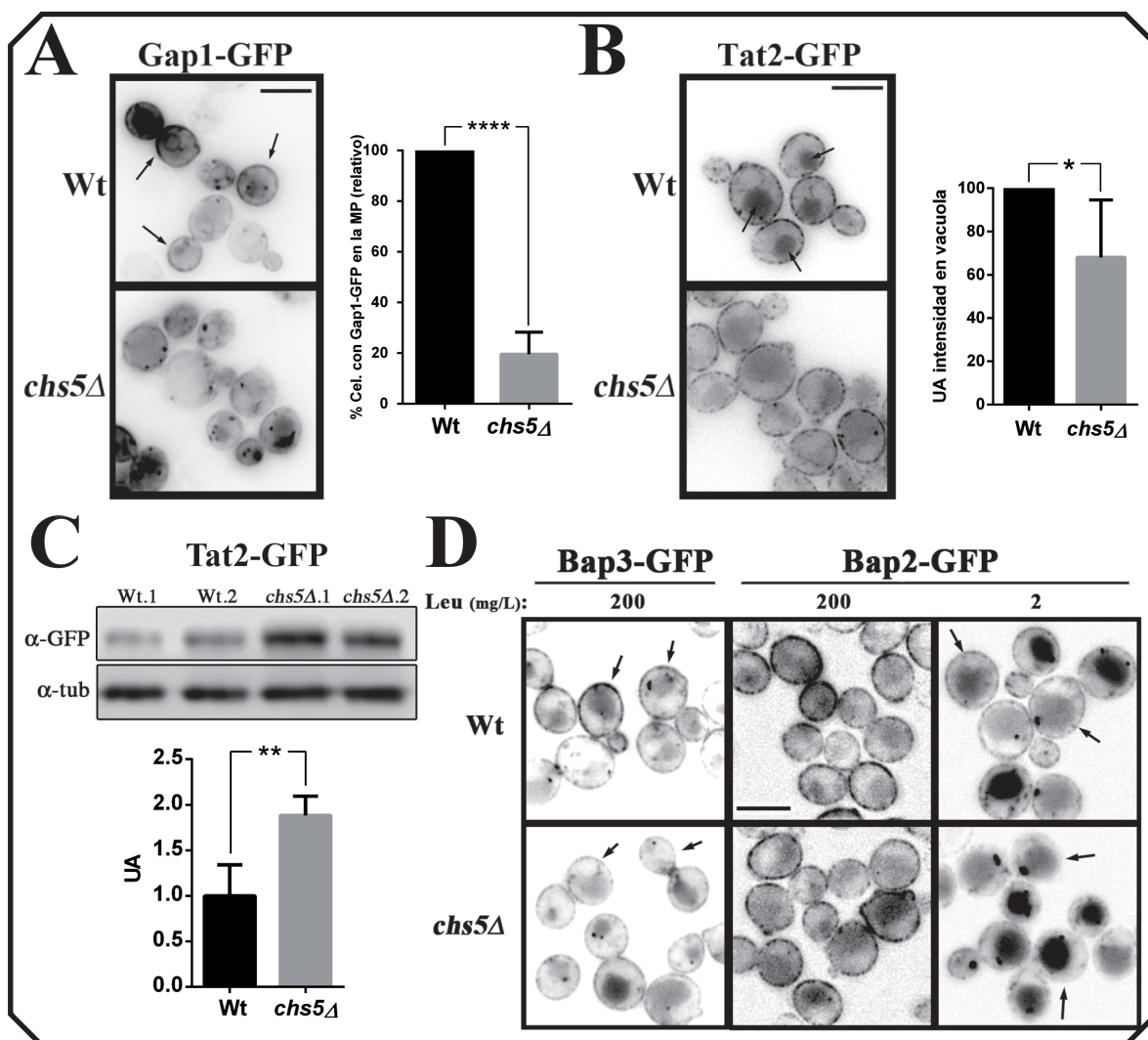


Figura C3.4. Localización de las permeasas del triptófano en el mutante *chs5Δ*. **A)** Localización de Gap1-GFP expresado en un plásmido bajo el control del promotor PGAL1 (YCp-PGAL1-GAP1-GFP-URA3). Se llevó a cabo en un medio a base de prolina y rafinosa como fuentes de nitrógeno y carbono respectivamente (YNb sin sulfato amónico y sin aa' 1,9 g/L, prolina 10 mM, rafinosa 2 %, CMS - uracilo, pH 6,2). Al cultivo en fase exponencial, se le añadió la galactosa al 2 % y a las 2 horas se tomaron las imágenes. Se cuantificó el porcentaje de células con señal en la membrana plasmática relativo a la cepa silvestre. **B)** Localización de Tat2-GFP (copia endógena marcada con GFP en su extremo C-terminal) y cuantificación de la intensidad de fluorescencia media en la vacuola con ImageJ, relativizada a la cepa silvestre. **C)** Análisis de la cantidad de proteína total de Tat2-GFP por 'western blot' y cuantificación con ImageJ. Se usaron dos clones diferentes (1 y 2) de ambas cepas, silvestre y *chs5Δ*. **D)** Localización de Bap3-GFP y Bap2-GFP (copia endógena marcada con GFP en su extremo C-terminal) a una concentración alta de L-leucina (200mg/L) y a una baja (2mg/L). Nótese una reducción de intensidad en la membrana plasmática del mutante *chs5Δ* en Bap3-GFP y principalmente en Bap2-GFP a concentración baja de leucina. Todos los experimentos han sido realizados en W303 y tienen un número de réplica ≥ 3 . Barra de escala representa 5 μ m.

de un deficiencia en la toma de triptófano. Sin embargo, no podemos excluir de la ecuación la enorme complejidad de la regulación metabólica por nitrógeno que podría estar afectando al comportamiento de Tat2 en la MP o afectar a la toma de triptófano a través de otras permeasas de menor especificidad para este aminoácido. En este sentido, *S.cerevisiae* presenta otras permeasas

con menor especificidad para el triptófano como Bap2, Bap3 y Tat1, que tampoco están reguladas por la vía NCR (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

Nuestro siguiente paso fue por lo tanto analizar la localización de las permeasas Bap2 y Bap3 (**Figura C3.4D**). La expresión de Bap2 y Bap3 es dependiente de los aa' que transportan, y fundamentalmente responde a los niveles de L-leucina (De Boer et al., 1998). En altos niveles de leucina (200 mg/L) Bap3 se encuentra localizada en la MP en ambas cepas. Sin embargo, los niveles de la proteína en la MP del mutante son claramente inferiores, lo que se corresponde también con menores niveles totales de la proteína en experimentos de 'western blot' (resultados no presentados). A baja concentración de Leucina (2mg/ml) la proteína no es detectable. La proteína Bap2 se localiza normalmente en la MP del mutante a altas concentraciones de leucina. Sin embargo, cuando crecen a baja concentración de este aa, aunque en ambas cepas se disminuye la localización de Bap2 en la MP, en el caso del mutante la reducción es mayor, quedando la proteína nítidamente acumulada en compartimentos intracelulares (**Figura C3.4D**). Podemos por tanto concluir que las permeasas Bap2 y Bap3 presentan también alterada su localización en el mutante *chs5Δ*, por lo que es posible que un defecto en el funcionamiento de estas permeasas contribuya a un menor transporte de triptófano y a la toxicidad al amonio que se observa en los fondos auxótrofos para el triptófano.

Los resultados descritos demuestran por tanto que los mutantes del exómero presentan alteraciones en la localización y niveles de varias permeasas de aa'. Esto podría explicarse por un efecto más o menos directo del exómero, en la permeasa o en algún elemento de las rutas de transporte que van a seguir estas permeasas; o por un efecto más indirecto, a través de algún elemento regulador que controle la síntesis o degradación de permeasas, siendo ambas posibilidades no excluyentes.

Los resultados obtenidos con la expresión regulada de Gap1 apoyarían la participación directa del exómero en el transporte de permeasas hacia la MP (**Figura C3.4A**). Sin embargo, los estudios preliminares con Tat2, Bap2 y Bap3 mostraron una posible implicación del exómero en el transporte intracelular hacia la vacuola (**Figura C3.4B,C,D**). Para corroborarlo, decidimos analizar en detalle el tráfico de Tat2-GFP hacia la vacuola. La eliminación del triptófano del medio de cultivo induce la endocitosis de Tat2 y su posterior degradación en la vacuola (Beck et al., 1999). Así, al pasar de un medio SDc a un medio SD con todos los aa' menos triptófano, la cepa control muestra un fuerte incremento de señal en la vacuola, mientras que en la cepa mutante el cambio es menos acusado (**Figura C3.5A**). De acuerdo con esto, el análisis por 'western blot' demostró que a los 60 minutos en ausencia de triptófano el porcentaje de degradación de Tat2-GFP es significativamente menor en la cepa *chs5Δ* que en la cepa control (**Figura C3.5B**).

Con el fin de discernir si la alteración que presenta el mutante *chs5Δ* en el transporte hacia la vacuola es exclusiva de Tat2 o también ocurre con otras permeasas, analizamos la endocitosis degradativa de la permeasa Mup1. Mup1 es la permeasa de alta afinidad para la metionina (Isnard et al., 1996) y su expresión y degradación responde directamente a los niveles de su sustrato, la metionina (Menant et al., 2006). Concretamente, en ausencia de metionina los niveles de Mup1 son máximos y la proteína se localiza en la MP (**Figura C3.5C**), la adición de metionina al medio provoca la ubiquitinación de la proteína mediada por Rsp5, su rápida endocitosis y su transporte hacia la vacuola para su degradación (**Figura C3.5C**), por lo que después de 90 minutos en metionina los

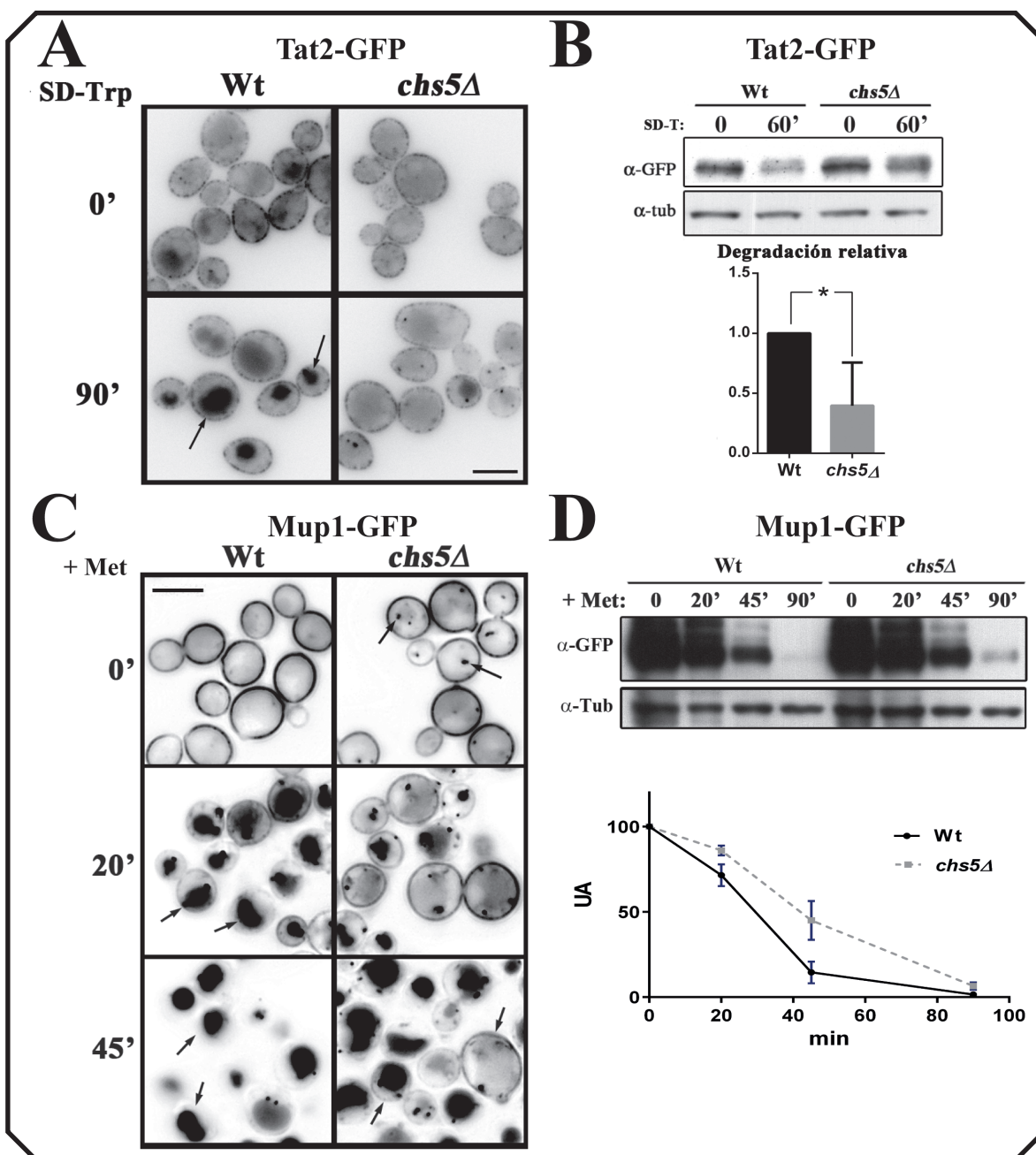


Figura C3.5. Degradación de las permeasas Tat2 y Mup1. **A)** Localización de Tat2-GFP (copia endógena marcada con GFP en su extremo C-terminal) tras la inducción de su degradación al eliminar el triptófano del medio. Nótese el incremento en la señal vacuolar en la cepa silvestre. **B)** Análisis por 'western blot' de la degradación de Tat2-GFP tras inducir su degradación. La cuantificación de la degradación relativa se llevó a cabo con ImageJ, y representa la proporción de Tat2-GFP perdida en 60 min de inducción de la degradación en las respectivas cepas, y relativizado a la cepa silvestre en cada experimento (3 réplicas). **C)** Localización de Mup1-GFP (copia endógena marcada con GFP en su extremo C-terminal) en un medio sintético definido sin metionina, y a diferentes tiempos tras la inducción de su degradación al añadir L-metionina (20 mg/L). Nótese la señal en puntos intracelulares en el mutante *chs5Δ* a tiempo 0, así como el transporte ralentizado hacia la vacuola en el mutante. **D)** Análisis por 'western blot' de los niveles de Mup1-GFP tras inducir su degradación. La cuantificación de la cantidad de Mup1-GFP se llevó a cabo con ImageJ. Todos los experimentos tienen un número de réplica ≥ 2 . Barra de escala representa 5 μm .

niveles de Mup1 son mínimos en 'western blot' (**Figura C3.5D**). De forma general el comportamiento de Mup1 en el mutante *chs5Δ* es similar, sin embargo, detectamos significativas diferencias temporales en el proceso. En ausencia de metionina los niveles totales de la proteína son similares a los de la estirpe control, pero una parte de la proteína permanece retenida en puntos intracelulares no caracterizados (**Figura C3.5C,D**). La adición de metionina al medio provoca el tráfico de Mup1 hacia la vacuola en ambas cepas. Sin embargo, en el mutante una parte significativa de la proteína permanece en la MP a los 20 minutos e incluso a los 40. En la misma línea, la disminución en los niveles de Mup1 está ralentizada en el mutante. Por lo tanto, podemos concluir que en el mutante *chs5Δ* también el tráfico de Mup1 está alterado, reduciéndose sus niveles de endocitosis y/o tráfico hacia la vacuola.

Teniendo en cuenta estos resultados, debemos concluir que el mutante del exómero tiene alterado el transporte de varias permeasas a distintos niveles. Así, no solo estaría alterado el transporte hacia la MP, como hemos visto con Gap1, sino que también está alterado el transporte a través de la ruta endosomal, como queda patente en las permeasas Tat2 y Mup1. Estas permeasas presentan una regulación dispar ya que mientras que Gap1 es dependiente de la NCR, Tat2 es dependiente del sistema SPS, y Mup1 es sensible a un exceso de su sustrato (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012), por lo que no es obvia una relación del exómero con la regulación de la expresión de estas proteínas. Debemos pues pensar en un efecto general del exómero en el tráfico intracelular de proteínas a nivel del TGN/EE, que como se ha descrito recientemente es un compartimento con funciones tanto en exocitosis como en endocitosis de proteínas transmembrana (Day et al., 2018).

6. El exómero y la sensibilidad a rapamicina.

En un contexto general de defectos en el metabolismo del nitrógeno asociados a la falta del exómero, no podemos olvidar la sensibilidad de estos mutantes a la rapamicina, sensibilidad que parece estar conservada a distintos niveles a lo largo de la escala evolutiva fúngica (Anton et al., 2018). Esta sensibilidad es típicamente asociada a defectos en la ruta TORC1, ruta que está directamente relacionada con el metabolismo del nitrógeno, regulando la síntesis, activación y degradación de permeasas a través de reguladores como PP2A y Npr1.

Para analizar una posible relación entre el exómero y la ruta TORC1 primero confirmamos que la hipersensibilidad a rapamicina es independiente de las auxotrofías de la cepa, tal y como se demuestra para la cepa protótrofa X2180 (**Figura C3.6A**). Posteriormente, en esta cepa se analizó el nivel de fosforilación de la subunidad ribosomal Rps6 que es una diana directa de la activación de TORC1, a través del cual la célula desvía la síntesis proteica a favor del anabolismo (González et al., 2015). La adición de una fuente preferente de nitrógeno (Glutamina) a células deplecionadas de nitrógeno provoca una fosforilación inmediata de Rps6 que se mantiene en el tiempo (**Figura C3.6B**). Esta fosforilación ocurre de forma similar en la estirpe *chs5Δ*, e incluso los niveles basales de fosforilación de Rps6 en medio SDc son similares a los de la estirpe control. Por lo tanto, parecería que la activación de la ruta TORC1 en presencia de nitrógeno ocurre normalmente en ausencia del exómero, aunque no podemos descartar totalmente pequeños defectos en la cinética de la activación a tiempos cortos.

Ante una ausencia de datos que apoyen la existencia de una alteración en los sistemas reguladores de la transcripción/traducción de permeasas de aa', como SPS y TORC1, podemos concluir que los problemas que presenta el exómero en el metabolismo del nitrógeno tienen su origen principal en

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

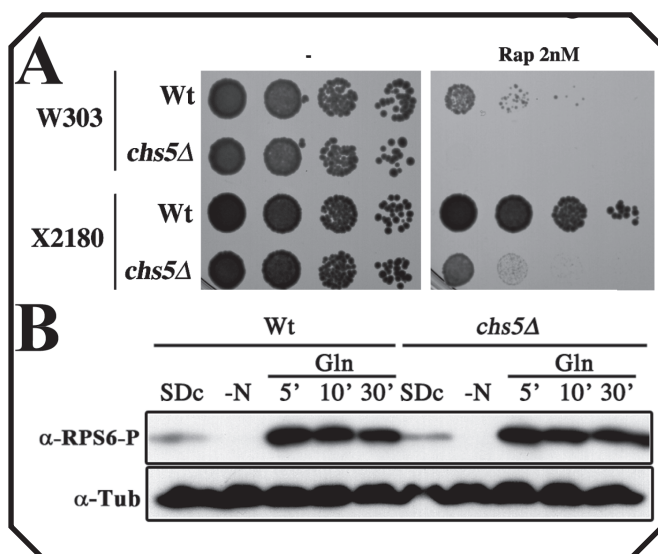


Figura C3.6. El exómero y la función de TORC1. A) Sensibilidad a la rapamicina del mutante del exómero *chs5Δ* en diferentes fondos genéticos. La preparación se realizó del mismo modo que en la figura C3.1 y se inocularon las gotas en un medio YEPD con/sin rapamicina (Santa Cruz Biotechnology). **B)** Análisis 'western blot' de la fosforilación de Rps6 con el anticuerpo 'Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody' (tabla 3). Se usaron cepas del fondo genético X2180-1A. Se crecieron en un medio sintético definido completo (SDc), luego se hizo un pase a un medio sin fuente de nitrógeno durante 1 hora (YNb sin sulfato amónico y sin aa' 1,9 g/L, dextrosa al 2%), y a continuación se añadió glutamina (concentración final 500 mg/L) y se recogieron muestras a los 5, 10 y 30 minutos. Los experimentos tienen un número de réplica ≥ 3 .

la alteración del transporte de las permeasas. Un fallo en el transporte de estas proteínas puede suponer una incapacidad para adaptarse al medio en situaciones nutricionales cambiantes. Así, por ejemplo, la exposición a rapamicina bloquea TORC1, lo que provoca una alteración nutricional drástica a la que el mutante del exómero pudiera no hacer frente debido a los problemas que presenta en el transporte de estas permeasas, explicándose así dicha hipersensibilidad al compuesto. Si esto fuese cierto, la conservación del fenotipo de hipersensibilidad a la rapamicina que presentan los mutantes del exómero en varias especies de hongos (Anton et al., 2018), podría estar señalando una función conservada para el exómero: el transporte de permeasas de aa'.

Tabla 1. Cepas (capítulo 3).

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM67	W303, mat a, (<i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>)	Colección del lab.
CRM2268	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4</i>	Colección del lab.
CRM2775	W303, mat a, <i>bch1Δ::kanMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM2778	W303, mat a, <i>bud7Δ::natMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM3068	W303, mat a, <i>chs6Δ::kanMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM3083	W303, mat a, <i>bch2Δ::natMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM3066	W303, mat a, <i>bch1Δ::kanMx4 bud7Δ::natMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM3081	W303, mat a, <i>chs6Δ::kanMx4 bch2Δ::natMx4</i>	(Anton et al., 2017)
CRM2688	W303, mat a, <i>trk1Δ::LEU2 trk2Δ::HIS3</i>	(Madrid et al., 1998)
CRM2689	W303, mat a, <i>ena1-4Δ::HIS3</i>	(Yenush et al., 2005)
CRM3155	W303, mat a, <i>aps1Δ::kanMx4</i>	Colección del lab.

CRM3157	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 aps1Δ::kanMx4</i>	Colección del lab.
CRM808	BY4741, mat a (<i>his3Δ1, leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0</i>)	EUROSCARF
CRM1435	BY4741, mat a, <i>chs3Δ::natMx4</i>	Colección del lab.
CRM2453	BY4741, mat a, <i>chs3Δ::natMx4 chs5Δ::hphNT1</i>	Colección del lab.
CRM2761	X2180-1A, mat a (<i>SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>)	Lab. Francisco del Rey
CRM2763	X2180-1A, mat a, <i>chs5Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM2783	X2180-1A, mat a, <i>ssy1Δ::natMx4</i>	Este trabajo
CRM3010	X2180-1A, mat a, <i>ssy1Δ::natMx4 chs5Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM2894	W303, mat a, <i>TAT2-GFP::hphNT1</i> clon1	Este trabajo
CRM2895	W303, mat a, <i>TAT2-GFP::hphNT1</i> clon2	Este trabajo
CRM2902	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 TAT2-GFP::hphNT1</i> clon1	Este trabajo
CRM2903	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 TAT2-GFP::hphNT1</i> clon2	Este trabajo
CRM3034	W303, mat a, <i>BAP2-GFP::hphNT1</i>	Este trabajo
CRM3687	W303, mat a, <i>BAP2-GFP::hphNT1 chs5Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM3030	W303, mat a, <i>BAP3-GFP::hphNT1</i>	Este trabajo
CRM3685	W303, mat a, <i>BAP3-GFP::hphNT1 chs5Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM3026	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 BAP3-GFP::hphNT1</i>	Este trabajo
CRM3531	W303, mat a, <i>MUP1-GFP::KanMx4</i>	Este trabajo
CRM3540	W303, mat a, <i>MUP1-GFP::KanMx4 chs5Δ::natMx4</i>	Este trabajo
CRM2868	W303, mat a, <i>PGAL1-GFP-SSY1::KanMx4</i>	Este trabajo
CRM2871	W303, mat a, <i>chs5Δ::natMx4 PGAL1-GFP-SSY1::KanMx4</i>	Este trabajo

Tabla 2. Plásmidos (capítulo 3).

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM160	pRS313 (<i>HIS3</i>)	Colección del lab.
CRM161	pRS314 (<i>TRP1</i>)	Colección del lab.
CRM264	pRS315 (<i>LEU2</i>)	Colección del lab.
CRM265	pRS316 (<i>URA3</i>)	Colección del lab.
CRM2546	pAG25 (<i>natMx4</i>)	(Goldstein and McCusker, 1999)
CRM1188	pUG6 (<i>kanMx4</i>)	(Goldstein and McCusker, 1999)
CRM1451	pFA6a- <i>hphNT1</i>	(Goldstein and McCusker, 1999)
CRM2827	pFA6a- <i>kanMx6-PGAL1-GFP</i>	(Longtine et al., 1998)
CRM1995	pFA6a- <i>GFP-hphNT1</i>	(Sato et al., 2005)
CRM1811	pFA6a- <i>GFP-natMx4</i>	(Sato et al., 2005)
CRM1994	pFA6a- <i>GFP-kanMx4</i>	(Sato et al., 2005)

METODOLOGÍA, RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CRM1356 YCp-PGAL1-GAP1-GFP-URA3

(Kota and Ljungdahl, 2005)

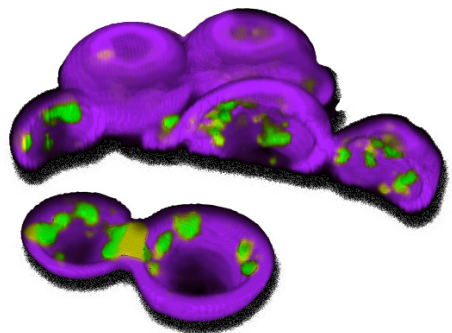
Tabla 3. Extracción y detección de proteínas (capítulo 3).

Proteína	Método de extracción	Desnaturalización	Anticuerpo
Tat2-GFP	TCA (Anton et al., 2017)	30 min a 37°C	anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (Living colors; Clontech)
Bap3-GFP	TCA	30 min a 37°C	anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (Living colors; Clontech)
Mup1-GFP	TCA	30 min a 37°C	anti-GFP JL-8 monoclonal antibody (Living colors; Clontech)
Rps6-P	TCA	5 min a 95°C	Phospho-(Ser/Thr) Akt Substrate Antibody #9611s (Cell SignalingTech) rabbit, cedido por Sergio Moreno. [BSA 5%, 1:1000, O/N]
Tubulina	TCA	Ambos	anti-Tubulin (T5162 ; Sigma)

Macro 1: MacroContajeColonia.ijm

```
showMessage("Abre la imagen"); //Open the Image
open();
rename("inicial");
run("Duplicate...", "");
run("Threshold..."); // to open the threshold window if not opened yet
waitForUser("set the threshold and press OK, or cancel to exit macro");
// pauses the execution and lets you access ImageJ manually
// as long as you don't press OK, which resumes the macro execution
run("Convert to Mask"); // to binarize, if you use this command, don't press 'Apply' in the threshold window
run("Watershed");
run("Invert");
rename("resultado");
imageCalculator("Subtract create", "inicial","resultado");
waitForUser("Calibracion: Dibujar recta con medida conocida \ne indicar la medida en Analize/SetScale, luego pulsa OK");
run("Threshold...");
waitForUser("Selecciona el Threshold y después lanza la opcion \nAnalyze Particles con la opcion ROI Manager");
```


DISCVSIÓN GENERAL



1. EL EXÓMERO: UN COMPLEJO PROTEICO ASOCIADO A LAS MEMBRANAS DEL COMPARTIMENTO TGN/EE

El exómero es un complejo proteico que se localiza en las membranas del compartimento red *trans*-Golgi (TGN)/endosoma temprano (EE) (Rockenbauch et al., 2012; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Para intentar entender el papel del exómero en esta localización hay que tener en cuenta que el concepto de este compartimento en *S. cerevisiae* se ha ido modificando a lo largo de los últimos años.

Pocos años atrás, se asumía la existencia de un orgánulo que mediaba directamente la función de exocitosis hacia la membrana plasmática (MP), el TGN. Además, existía la concepción de un compartimento exclusivo que recibiría las vesículas de endocitosis desde la MP, así como vesículas con diferente contenido desde el TGN, el EE. Desde este compartimento comenzaría la ruta endosomal, que a través del compartimento prevacuolar (PVC), también llamado endosoma tardío (LE) o cuerpo multivesicular (MVB), se conectaría con la vacuola. Además, el EE era el lugar encargado del reciclaje de las proteínas endocitadas enviándoselas al TGN, para que este último las enviase a la MP (MacDonald and Piper, 2016). Sin embargo, múltiples evidencias indicaban que las interpretaciones que se habían hecho del sistema podrían no haber sido las adecuadas para *S. cerevisiae*. Recientemente se ha descrito por el laboratorio del Profesor Benjamin S. Glick (Day et al., 2018), que el conjunto de orgánulos que presenta la levadura de gemación podría ser aparentemente más reducido aún de lo que se creía. Así, existirían los compartimentos aparato de Golgi y PVC con una considerable estabilidad temporal. Y entre ambos compartimentos, existiría una estructura extremadamente dinámica, donde las proteínas, llegando desde múltiples orgánulos, serían segregadas en diferentes dominios gracias a la acción de los complejos adaptadores, para después ser transportadas a la MP, Golgi o PVC. Esta región TGN o TGN/EE, desempeñaría las funciones tanto del TGN como las de los EE. Teniendo en cuenta esto, la sucesión ordenada de complejos adaptadores que se van reclutando a las membranas del TGN descrita en *S. cerevisiae* (Daboussi et al., 2012), ahora se correspondería con el compartimento TGN/EE. Y por lo tanto, la localización amplia y central que presenta el exómero en esta 'escalera' de adaptadores (resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero), explicaría un posible papel del exómero en la segregación de proteínas de membrana en múltiples dominios del TGN/EE, abriéndose así un abanico de posibles implicaciones del exómero en el transporte hacia diferentes localizaciones.

En base a los resultados aquí descritos, el exómero de *S. cerevisiae* está implicado en el transporte polarizado de varias proteínas transmembrana desde TGN/EE hasta la MP. Además, los últimos resultados evidencian funciones del exómero en la segregación de proteínas con destinos diferentes a las regiones de crecimiento polarizado de la MP. Tal es el caso del sensor de la ruta RIM101, localizado en regiones corticales a lo largo de todo el contorno celular (Anton et al., 2017). También, datos obtenidos en *S. pombe*, implican al exómero de esta especie en el transporte proteico hacia diferentes compartimentos, y colaborando con múltiples complejos adaptadores (Hoya et al., 2017).

2. FUNCIONES DESCRITAS PARA EL EXÓMERO

2.1. Transporte de los cargos *bona fide*: ¿proteínas únicas de *Saccharomyces*?

Antes incluso de haberse descrito la existencia del complejo del exómero, algunas de las proteínas que lo conforman (Chs5 y Chs6) fueron descritas como proteínas indispensables para el transporte de la subunidad catalítica de la quitín sintasa III, Chs3 (Santos and Snyder, 1997). Esta proteína con 6 dominios transmembrana está implicada en la síntesis de quitina de la pared celular, y su transporte está altamente regulado, siendo dependiente de múltiples proteínas específicas, incluidas Chs5 y Chs6 (Roncero, 2002; Roncero et al., 2016; Sacristan et al., 2013; Valdivieso et al., 1991). Poco después, se describió la dependencia de Fus1 por Chs5 para su transporte hacia la MP (Santos and Snyder, 2003). Esta dependencia explicaba, al menos en parte, los problemas de conjugación previamente descritos en la cepa *chs5Δ* (Santos et al., 1997), ya que Fus1 es una proteína con un dominio transmembrana e implicada en la conjugación (Trueheart et al., 1987).

Una vez definido el exómero como complejo proteico, se corroboró que el transporte de Chs3 y Fus1 hacia la MP depende de Chs5, la subunidad principal del complejo, y de al menos alguno de los parálogos de la familia de los ChAPs (Barfield et al., 2009; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Posteriormente, y como resultado de un análisis de la composición de las vesículas recubiertas por el exómero, se describió la dependencia de Pin2 por el exómero para su transporte también hacia la MP (Ritz et al., 2014). Pin2 es una proteína de función desconocida que presenta un dominio transmembrana, y un dominio priónico que media su agregación en determinadas condiciones (Ritz et al., 2014).

En el campo del tráfico intracelular de levaduras, estas proteínas son conocidas como los cargos del exómero, ya que en ausencia de este complejo quedan completamente bloqueadas en el TGN/EE (Spang, 2015). Sin embargo, además de la dependencia por el exómero para su transporte presentan otras características compartidas que los hace aún más especiales. (1) Su localización en la MP está **fuertemente polarizada**. Fus1 se concentra en la punta del 'shmoo' durante el proceso de conjugación (Santos and Snyder, 2003). Pin2 se concentra en el cuello durante la citoquinesis y en las yemas incipientes (Ritz et al., 2014). Y Chs3 también se distribuye en la yema y el anillo de citoquinesis (Chuang and Schekman, 1996; Zanolari et al., 2011; Ziman et al., 1998). (2) Además, las tres proteínas presentan múltiples modificaciones post-traduccionales (Arcones et al., 2016; Ren et al., 2008; Ritz et al., 2014; Sacristan et al., 2013; Swaney et al., 2013; Trueheart and Fink, 1989), probablemente ligadas a la **compleja regulación post-traducciona** que demostraron al menos para dos de ellas, Chs3 y Pin2. Así, Chs3 es una proteína con una excepcional regulación post-traducciona, que permite mantener un cantidad estable de la proteína ciclando entre el compartimento TGN/EE y la MP; proceso dependiente del ciclo celular (Arcones et al., 2016; Roncero et al., 2016; Zanolari et al., 2011). En el caso de Pin2, también se ha descrito una fuerte regulación de su exocitosis y endocitosis que le permite ciclar de una forma similar a Chs3 (Ritz et al., 2014). (3) Finalmente, las tres proteínas, en ausencia del exómero, consiguen escapar de su retención en el TGN/EE si se elimina el complejo adaptador AP-1 (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Valdivia et al., 2002), o la interacción con dicho adaptador es eliminada (Starr et al., 2012). Es lo que se conoce como apertura de la **ruta alternativa hacia la MP**. Por lo tanto, las proteínas denominadas cargo del exómero, son bloqueadas completamente en el TGN/EE gracias a su interacción con AP-1, que es quien las retiene

activamente. Hay que destacar que la localización en la MP al abrir la ruta alternativa es mucho menos polarizada que la que genera el exómero.

Centrándonos en esta última característica, los tres cargos del exómero, a través de sus regiones citosólicas, interaccionan físicamente tanto con el exómero como con el complejo adaptador AP-1 en el compartimento TGN/EE (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Sanchatjate and Schekman, 2006; Starr et al., 2012; Valdivia et al., 2002; Weiskoff and Fromme, 2014). En *S. cerevisiae*, el TGN/EE es una región muy dinámica a la que se van a reclutar gran variedad de complejos y proteínas adaptadoras (Daboussi et al., 2012). Estos complejos van a mediar, o bien la acumulación de cargos en un tipo específico de vesícula, o bien la segregación de estos en áreas concretas del TGN/EE. Posteriormente, muchas de estas proteínas concentradas serán enviadas a otro compartimento a través de intermediarios de transporte específicos (Bonifacino, 2014). Así, en el TGN/EE se mediará tanto la exocitosis de las proteínas sintetizadas *de novo*, como la recepción de las proteínas endocitadas en la MP, para después reciclarlas o enviarlas al compartimento PVC para su degradación final en la vacuola (Day et al., 2018; MacDonald and Piper, 2016). Para que todo esto sea posible tiene que haber una interacción física entre los diferentes adaptadores y la proteína cargo, como ocurre con los cargos del exómero, que interaccionan tanto con AP-1 como con el exómero en el mismo compartimento. De este modo, probablemente exista una competencia y/o colaboración entre estos dos complejos para reconocer las señales presentes en los dominios citosólicos de los cargos del exómero, como se ha sugerido entre otros adaptadores y proteínas cargo del TGN en mamíferos (Bonifacino, 2014). En este sentido, aun siendo resultados preliminares, estudios de interacción *in vivo* usando la técnica BIFC (Bimolecular Fluorescence Complementation (Miller et al., 2015)) han identificado una relación física entre el exómero y AP-1 (resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero).

En este contexto de interacciones entre proteínas, y aplicando el concepto darwiniano de la selección natural a la evolución de las proteínas, las interacciones presentes entre un cargo y los adaptadores en una especie actual, serán el resultado del proceso de co-evolución sufrido entre todas las proteínas implicadas. Sorprendentemente, en el caso de Chs3, el único cargo del exómero descrito hasta la fecha y altamente conservado fuera del género *Saccharomyces*, dos de los tres elementos de esta interacción tripartita, cargo-exómero-AP-1, presentan una gran divergencia evolutiva. Así, fuera de este género el número de ChAPs está reducido, solo hay 1 o 2 ChAPs en vez de los 4 presentes en *S. cerevisiae*. Además, la fuerte dependencia de Chs3 por el ChAP Chs6 no parece muy antigua, ya que Chs6 pertenece a la familia de ChAPs que apareció más recientemente (Ramirez-Macias et al., *in press*; Roncero et al., 2016). Por otro lado, las regiones citosólicas por donde Chs3 interacciona con AP-1 y exómero presentan baja conservación en sus homólogos fuera del género *Saccharomyces* (Anton et al., 2018).

Teniendo en cuenta la baja conservación de las secuencias de los elementos que median las interacciones de los cargos del exómero en *S. cerevisiae*, analizamos las interacciones entre el exómero y su cargo Chs3 en otras especies. Decidimos analizar el comportamiento de los homólogos de Chs3 en una especie Basidiomycota, *Ustilago maydis*, y dos Ascomycotas dentro del clado Saccharomycotina, *Candida albicans* y *Kluyveromyces lactis*. Sorprendentemente, en ninguna de las tres especies analizadas, la delección del homólogo de *CHS5* comportaba un bloqueo en la síntesis de quitina dependiente de Chs3. Confirmando lo que se podía inferir del análisis *in silico* de las secuencias de los genes implicados, los cargos *bona fide* del exómero parecen ser algo exclusivo

de *S. cerevisiae*.

A pesar de estos resultados que hacían replantearse la función conservada del exómero, se observó que aunque el homólogo de Chs3 en *C. albicans* es capaz de llegar a la MP en ausencia del exómero, su localización presenta un patrón significativamente alterado. Además, mediante experimentos con proteínas Chs3 híbridas se demostró una pobre conservación de las interacciones implicadas en el transporte de Chs3 hasta la MP. Por lo tanto, estos datos apuntan a que parte de las características que habían definido los cargos *bona fide* del exómero parecen ser fruto de la específica co-evolución sufrida entre el cargo, exómero y AP-1 a lo largo de la evolución del género *Saccharomyces* (Anton et al., 2018). Idealmente, esta afirmación debiera ser ratificada analizando más cargos del exómero que presentasen homólogos en otras especies. Ni Fus1 ni Pin2 parecen tener homólogos fuera del género *Saccharomyces*. Sin embargo, existe otra proteína, Flc2, recientemente descrita como cargo del exómero en *S. cerevisiae* (resultados no publicados, Anne Spang) que presenta un homólogo en *C. albicans*, y cuyo homólogo de esta proteína se comporta exactamente igual que el homólogo de Chs3 en *C. albicans* (resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero). Esta evidencia apoya la idea de que los cargos *bona fide* del exómero descritos en *S. cerevisiae* presentan unas características que probablemente no existan fuera del género, cuestionando un papel general del exómero como adaptador de cargo.

2.2. Asistencia al transporte de otros cargos polarizados

Parece claro que los cargos *bona fide* no serían el ejemplo más fidedigno de la función conservada del exómero. Sin embargo, se han descrito otras proteínas cuyo transporte hacia la MP tiene cierta dependencia por el exómero. Por ejemplo, las proteínas homólogas a los cargos *bona fide* en *C. albicans*, Chs3 y Flc2, tienen alterada su llegada a la MP en los mutantes del exómero, perdiendo parcialmente su localización polarizada durante el crecimiento vegetativo. Además, durante el crecimiento hifal su distribución en la punta está alterada en el mutante (Anton et al., 2018; resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero). Por lo tanto, estas proteínas, al igual que cargos *bona fide*, tienen una localización fuertemente polarizada que se ve alterada en ausencia del exómero. De la misma forma, se han identificado otras proteínas cuyo transporte polarizado hacia la MP se ve comprometido en ausencia del complejo del exómero, como es el caso de la bomba extrusora de cationes Ena1 (Anton et al., 2017).

Por lo tanto, es posible que la asistencia al transporte de proteínas con distribución polarizada en la MP sea la característica que defina mejor la función conservada del exómero. Y sobre esta función conservada, en *S. cerevisiae*, se hayan añadido otras peculiaridades que han generado una total dependencia por el exómero para salir del compartimento TGN/EE.

Otras proteínas de la membrana plasmática han sido también relacionadas con el exómero. Así, Skg6, una proteína de función desconocida con un dominio transmembrana y varias modificaciones post-traduccionales (Swaney et al., 2013), fue identificada en el análisis de las vesículas del exómero que permitió la identificación del cargo Pin2 (Ritz et al., 2014). A pesar de constatar la presencia de Skg6 en las vesículas/regiones recubiertas por el exómero, su transporte polarizado hacia la MP, al menos en condiciones de crecimiento estándar, no se mostraba alterado en los mutantes del exómero. Según los autores del estudio, a diferencia de Chs3, Fus1 y Pin2, la célula sería capaz de transportar a Skg6 por dos rutas diferentes, una mediada por el exómero y otra independiente. Más recientemente, en *S. pombe* se ha descrito una disminución del transporte de la proteína Syb1 en

los mutantes del exómero (Hoya et al., 2017). Esta v-SNARE homóloga a Snc1/2 de *S. cerevisiae*, está implicada en el transporte entre el TGN/EE y la MP, y presenta una localización polarizada (Edamatsu and Toyoshima, 2003). Aunque no se comporta igual que Ena1, Syb1 sería también una proteína polarizada en la MP y cuyo transporte se ve parcialmente alterado en ausencia del exómero.

Parece por tanto claro que el exómero participa en el transporte de proteínas de la MP con una fuerte polarización. Sin embargo, no todas las proteínas polarizadas muestran defectos en ausencia del exómero. Así, en condiciones de crecimiento estándar, los homólogos de Syb1 en *S. cerevisiae*, Snc1/2, no tienen una alteración significativa. Tampoco Hxt7 ni Stl1, dos proteínas transmembrana cuyo transporte hasta la MP es dependiente del Sro7, al igual que lo son Chs3 y Ena1 (Anton et al., 2017). Es posible que en unas condiciones concretas, alguna de estas proteínas u otras no identificadas aún, requieran del exómero para su correcta disposición en la MP, algo que puede ser técnicamente difícil de demostrar si las diferencias de localización son menores. Sorprendentemente, hasta la fecha no se ha descrito una secuencia o estructura común que sea reconocida por el exómero, y lo único que comparten todas las proteínas relacionadas con el exómero es una distribución polarizada y la presencia de 1 hasta 10 dominios transmembrana.

2.3. Otras funciones del exómero en el compartimento TGN/EE

El mutante *chs5Δ* de *S. cerevisiae* muestra una alteración en los niveles proteicos de los canales Ena1 y Qdr2. Este problema está asociado a una alteración transcripcional por el mal procesamiento del represor transcripcional Rim101 (Anton et al., 2017). Este factor, a través de la represión de otros moduladores de la expresión génica, como Nrg1 y Smp1, permite la adaptación a diversos estreses iónicos (Ariño et al., 2010; Serra-Cardona et al., 2015). Para su función requiere de un procesamiento proteolítico mediado por una cascada de transducción que se activa por un cambio en el potencial de membrana (Obara and Kihara, 2014; Peñalva et al., 2014). El análisis de la localización de los distintos elementos de la ruta de transducción en el mutante del exómero, evidenció una distribución alterada del sensor de la ruta, conformado por Rim21, Dfg16 y Rim9 (Anton et al., 2017) (**Figura C1.1**). Estas proteínas se ensamblan en puntos corticales a lo largo de toda la MP, y en ausencia del exómero se pierde tanto la distribución cortical como el número y morfología de los puntos. Por lo tanto, la correcta disposición de estas estructuras depende del complejo del exómero. La localización de estas estructuras es muy particular, ya que a pesar de ser cortical, no colocaliza con ningún dominio de la MP descrito hasta la fecha ni con el RE cortical (Obara and Kihara, 2014; Obara et al., 2012). Lo que es innegable es que dicha localización no se corresponde con la zona de crecimiento activo ni con el cuello en citoquinesis. Por lo tanto, el exómero está implicado en la concentración del sensor de la ruta RIM101 en unas regiones corticales específicas; una nueva función más allá de la localización de proteínas fuertemente polarizadas.

Además del sensor de la ruta RIM101, varias evidencias señalan al exómero como complejo implicado en el transporte de proteínas hacia múltiples destinos. Así, en *S. pombe*, el exómero tiene implicaciones tanto en el transporte hacia la MP como hacia el compartimento prevacuolar (Hoya et al., 2017). También durante el desarrollo de esta tesis se han detectado implicaciones del exómero en el transporte de proteínas implicadas en el metabolismo del nitrógeno, que tienen una distribución polarizada o no. Así, la permeasa general de aminoácidos Gap1, en los mutantes del exómero presenta una disminución en la polarización y en su cantidad en la MP. Por otro lado, las permeasas Bap2 y Bap3, proteínas sin una fuerte polarización, presentan menos cantidad de

proteína en la MP de la cepa *chs5Δ*. Además, el tráfico de las permeasas Tat2 y Mup1 hacia la vacuola está alterado en el mutante del exómero.

Aunque alguna de estas alteraciones pudiera ser debida a efectos indirectos, el continuo incremento en el número de proteínas que en ausencia del exómero presenta problemas en la localización en múltiples compartimentos celulares, parecen evidenciar un papel para el exómero mucho más amplio de lo descrito en los últimos años. Por lo tanto, es posible que el exómero, en lugar de mediar directamente el transporte de tan variopinto grupo de proteínas, tenga un papel más general en el mantenimiento de la estructura del TGN/EE. De este modo, una alteración en un compartimento a partir del cual salen proteínas hacia casi todos los destinos celulares, podría suponer alteraciones en la localización final de múltiples proteínas. En consonancia con esta posible función más general, el exómero parece estar implicado en la remodelación de membranas en el TGN/EE a través de un efecto amplificador de la función de vesiculación de Arf1 (Paczkowski and Fromme, 2014; Richardson and Fromme, 2013). También, en relación a esta función, el análisis *in vivo* de las regiones recubiertas por Sec7, marcador de TGN/EE, ha revelado una disminución en el número de eventos de fusión y escisión de estas estructuras en el mutante del exómero (resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero). Por lo tanto, el exómero, ya sea de forma directa participando activamente en el transporte de múltiples proteínas transmembrana o de forma indirecta estructurando el TGN/EE, tiene implicaciones en la correcta localización de proteínas transmembrana en múltiples compartimentos.

3. EL EXÓMERO Y LA RESPUESTA AL ESTRÉS

Las levaduras están expuestas a múltiples agentes dañinos ante los que han desarrollado mecanismos de adaptación. Algunos mecanismos suponen un cambio total en el metabolismo y morfología del organismo, otros mecanismos permiten una adaptación en pocas horas o minutos, e incluso hay mecanismos casi instantáneos que suponen modificaciones post-traduccionales que reordenan las proteínas y lípidos pre-existentes con el fin de adaptarse a cambios agudos. Las adaptaciones a largo plazo suelen implicar cambios en la transcripción y traducción de proteínas. Sin embargo, para hacer frente a un estrés agudo, los organismos precisan de una respuesta más rápida, que una vez ha actuado permitiendo la viabilidad a tiempos cortos, posibilita la acción de las respuestas a medio-largo plazo. En esta respuesta rápida, es muy importante el compartimento que primero entra en contacto con el estrés, la PC y la MP. Para la regulación de dicho compartimento es clave el papel del TGN/EE, ya que permitirá el abastecimiento de nuevas proteínas, así como la recepción de las que ya no son necesarias, bien para ser posteriormente recicladas o para enviarlas a degradar en la vacuola (Day et al., 2018; MacDonald and Piper, 2016). En este contexto, el complejo del exómero y sus cargos han sido implicados en múltiples procesos de respuesta a estrés.

Ante un estrés térmico agudo, Chs3 es transportado masivamente desde el compartimento TGN/EE hasta la MP en un proceso que es tanto dependiente de la ruta de integridad de la pared celular (CWI) como del complejo del exómero (Valdivia and Schekman, 2003). De este modo, la célula además de sintetizar *de novo* la proteína, proceso que requiere un tiempo considerable, mantiene un reservorio de Chs3 en el TGN/EE. Esto lo consigue evitando su transporte hacia la vacuola por un doble mecanismo. En primer lugar, AP-1 interacciona con Chs3 reteniendo la mayoría a nivel del TGN/EE (Valdivia et al., 2002). Y en segundo lugar, el retrómero recicla un pequeño porcentaje de Chs3 a

nivel del compartimento prevacuolar (Arcones et al., 2016). Este reservorio permite abastecer a la MP con la quitín sintasa en diferentes puntos del ciclo celular (Zanolari et al., 2011), así como ante diferentes estreses (Valdivia and Schekman, 2003), lo que va a permitir reforzar la síntesis de quitina en la PC. Por otro lado, el cargo del exómero Pin2, responde ante múltiples estreses endocitándose y acumulándose en el TGN/EE. Una vez ha desaparecido el estrés, de forma dependiente del exómero, es liberado inmediatamente a la MP (Ritz et al., 2014). Aunque se desconoce la función de Pin2, se ha postulado que pueda funcionar como un receptor de estrés. También, en situaciones de estrés catiónico agudo, es necesaria la función del exómero para el transporte polarizado de Ena1 a los sitios de crecimiento activo en la MP (Anton et al., 2017). Esta bomba, con el consumo acoplado de ATP, es capaz de expulsar iones tóxicos como Li^+ y Na^+ (Ariño et al., 2010; Serra-Cardona et al., 2015). Las regiones de crecimiento activo son especialmente sensibles a estos iones, por lo que una acumulación de esta proteína en la zona permitiría un alivio rápido del estrés.

Consecuentemente, el exómero permite el transporte masivo y concentrado de proteínas con importancia en la respuesta a múltiples estreses en la MP. Pero no solo participa de una forma activa, sino que también permite una correcta respuesta al estrés catiónico regulando la localización pasiva de los elementos de la ruta RIM101. El sensor de la ruta tiene una localización cortical muy especial que ha resultado ser dependiente del exómero (Anton et al., 2017; resultados no publicados, C. Antón y C. Roncero). Sin esta precisa localización, ante un proceso de alcalinización del medio, el sensor no responde correctamente, lo cual impide el procesamiento proteolítico de Rim101 y con ello, la falta de respuesta transcripcional ante el estrés. Por lo tanto, el exómero es un elemento importante en la respuesta celular a múltiples tipos de estrés.

4. ELEXÓMERO, UN COMPLEJO PROTEICO EVOLUTIVAMENTE CONSERVADO QUE HA SUFRIDO NEOFUNCIONALIZACIÓN

Una característica que define a los eucariotas es la sub-compartimentalización de los procesos biológicos. Entre estos compartimentos se ha establecido una compleja maquinaria que se conoce como el sistema de tráfico membranoso. Este sistema ha permitido incrementar el número de funciones y capacidades celulares exponencialmente. Entre sus múltiples capacidades podemos resaltar que permite la remodelación rápida de la superficie celular, la secreción masiva de proteínas capaces de modificar el ambiente, la endocitosis de nutrientes, la fagocitosis de otros organismos, el secuestro de diferentes procesos metabólicos en compartimentos definidos, así como se cree que ha servido para integrar las primeras interacciones endosimbiontes (Schlacht et al., 2014).

Este sistema de membranas está controlado por gran variedad de proteínas que permitirán definir la composición de los compartimentos y el transporte entre los mismos. Cabe destacar las GTPasas y sus reguladores, los adaptadores de cargo, cubiertas, elementos amarra y SNAREs. Los mecanismos y elementos básicos de este transporte están bien conservados en la escala evolutiva, pero su complejidad y variedad es enorme, lo que permite generar soluciones específicas para el transporte entre los diferentes orgánulos (Schlacht et al., 2014). Muchas de estas proteínas son parálogos entre sí, y conforman grandes familias. Cada parólogo lleva a cabo una función similar, pero dicha función la desarrolla en otras rutas u orgánulos diferentes (Bonifacino and Glick, 2004). El análisis filogenético de las secuencias de estos elementos, la comparación de genomas y el

modelado matemático, han permitido desarrollar modelos evolutivos del sistema membranoso y su maquinaria. La teoría predominante actual para explicar la evolución de los orgánulos de origen no endosimbiótico es la **hipótesis de los parálogos en los orgánulos** (Dacks and Field, 2007). Esta hipótesis sugiere que la duplicación de genes parálogos y una posterior neofuncionalización de los mismos (adquisición de nuevas funciones) es un mecanismo mucho más flexible para la diversificación de los orgánulos que, o bien definir un nuevo orgánulo con grupos no relacionados de proteínas, o bien requerir de la co-evolución de un número grande de proteínas que genere una nueva especificidad (Dacks and Field, 2007). Esta teoría basada en datos obtenidos *in vivo* e *in silico*, ha permitido establecer una conexión entre los sistemas membranosos de los actuales organismos eucariotas, así como postular las características del hipotético último ancestro común eucariota o **LECA** (Last Ekarioic Common Ancestor). Actualmente los datos evidencian un modelo donde LECA fuese un organismo complejo, con la mayor parte de los elementos presentes en los organismos eucariotas actuales. A partir de este modelo ancestral se han producido pérdidas de determinadas rutas y complejos proteicos en diferentes linajes, a la vez que se han adquirido nuevos elementos fundamentalmente gracias a la generación de parálogos que por diferentes reestructuraciones o mutaciones han adquirido nuevas funciones (Schlacht et al., 2014).

El actual conocimiento de los complejos proteicos que participan en la deformación de membranas, y en definitiva controlan el sistema membranoso, permite clasificarlos en tres grupos estructurales. (1) El complejo del ESCRT donde se incluyen las proteínas con dominios deformadores de membrana tipo Snf7, que participan en el transporte endosomal tardío y en la citoquinesis. (2) Las proteínas con dominios BAR (Bin, Amphiphysin and Rvs), con un papel en la región de interacción entre Golgi y endosomas, así como en fagocitosis y en citoquinesis. (3) Y el grupo derivado del Protocoatómero, que es el que domina en términos de número de complejos y el rango de arquitecturas que son capaces de formar. En este grupo se incluirían los coatómeros COPI y COPII, los adaptadores de clatrina y diversos complejos amarra que participan en múltiples procesos dinámicos como la exocitosis, endocitosis y tráfico intracelular; y otros complejos como el complejo del poro nuclear, que permiten mantener estructuras estables. En este tercer grupo, hay un subgrupo claramente definido, el grupo adaptina/COPI/clatrina. Es el grupo que, teniendo en cuenta las evidencias actuales, es más compacto evolutivamente hablando. Y, si consideramos la semejanza estructural del dominio N-terminal de Chs5 con el dominio apéndice de las adaptinas (Paczkowski et al., 2015), es al cual pertenecería el complejo del exómero. Revisado en Rout and Field, 2017.

En este contexto evolutivo, el complejo del exómero solo está presente en el clado Fungi (Ramirez-Macias et al. *en revisión*). Aunque la subunidad ChAP es una proteína con presencia en otros grandes linajes eucariotas, la aparición de Chs5 y la plausible conformación del exómero como complejo proteico se remonta al inicio de la diversificación del linaje de los hongos (Trautwein et al., 2006; Ramirez-Macias et al. *en revisión*). El dominio TPR, representativo de los ChAPs, está presente en otras proteínas y es importante para la interacción proteína-proteína (Rockenbauch et al., 2012), pero no es un elemento que actualmente defina ninguno de los grupos mayores de complejos proteicos que controlan el sistema membranoso. En cambio, el dominio N-terminal de la subunidad principal Chs5 (y sus homólogos), aunque por secuencia no está presente en ninguna otra proteína, su conformación tridimensional lo asemeja a los dominios apéndice de las adaptinas mayores de los complejos AP (Paczkowski et al., 2015).

Existen evidencias que apuntan a una conservación parcial de las funciones entre los homólogos de Chs5 de linajes fúngicos tan dispares como Zigomycota, Basidiomycota y Ascomycota (Ramirez-Macias et al. *en revisión*). Esta evidencia apoyaría la idea de la existencia del exómero como complejo proteico en las especies antecesoras próximas al antepasado común a los hongos actuales. Como se ha descrito, el exómero media el transporte proteico a nivel del TGN/EE en múltiples especies fúngicas (Anton et al., 2017, 2018; Barfield et al., 2009; Hoya et al., 2017; Rockenbauch et al., 2012; Wang et al., 2006), y gran parte de las proteínas descritas como cargos del exómero tienen como destino la MP. Otro complejo presente en la región TGN/EE, el complejo AP-4, está distribuido ampliamente a lo largo del dominio eucariota y parece mediar funciones de transporte hacia la MP, que aparentemente se solaparían en parte con el exómero (Bonifacino, 2014). Coincidentemente, en aquellos organismos que existen homólogos de Chs5 y ChAP, no se detecta la presencia de un complejo AP-4 (Barlow et al., 2014; Ramirez-Macias et al. *en revisión*). Por lo tanto, en ausencia de estudios más exhaustivos, se podría hipotetizar con una pérdida del complejo AP-4 debida a la coexistencia y posterior prevalencia del complejo del exómero en las primeras especies fúngicas.

Aun suponiendo la existencia de un complejo exómero en todos los linajes fúngicos, no todos tendrían porque llevar a cabo las mismas funciones. Existen numerosas evidencias que señalan a una especialización del exómero acaecida en el clado Ascomycota, con su máximo exponente en *S. cerevisiae* (Anton et al., 2018). Cuando uno analiza los fenotipos descritos para el mutante del exómero de *S. cerevisiae* en otras especies donde se ha eliminado el exómero, como la sensibilidad a calcoflúor, litio, sodio o higromicina, el resultado es cuanto menos inesperado incluso en especies filogenéticamente próximas como *C. albicans* (Anton et al., 2018; Hoya et al., 2017). Solo existe una fuerte conservación del fenotipo de hipersensibilidad a litio e higromicina en los mutantes de *K. lactis*. En este contexto hay que tener en cuenta que las especies fúngicas se han adaptado a nichos de lo más variopintos. Así, dentro del clado Ascomycota existen especies patógenas de animales o de plantas, simbioses, saprófitos del suelo o comensales. Por lo tanto, es posible que la baja conservación de estos fenotipos se deba a que las proteínas y el contexto biológico sobre el que actúe el exómero sean considerablemente diferentes en cada especie. Pero además, hay que tener en cuenta el proceso de generación de parálogos y posterior neofuncionalización que han sufrido los ChAPs en este grupo (Anton et al., 2018; Ramirez-Macias et al. *en revisión*). Una primera duplicación al inicio de la diversificación del clado Saccharomycotina generó 2 ChAPs, lo cual permitió la posibilidad de neofuncionalización para el complejo del exómero. Sin embargo, al menos para los fenotipos analizados, parece que la neofuncionalización y segregación de funciones entre los ChAPs no tuvo lugar hasta después de la segunda duplicación que generó 4 ChAPs en el antecesor común a las especies del género *Saccharomyces*. Así, en *S. cerevisiae* la sensibilidad al litio es dependiente de la pareja Bch2/Chs6, la sensibilidad a la higromicina depende de Bch1/Bud7, y el transporte de Chs3 es dependiente de Chs6 y una fuerte interacción con el complejo AP-1 (Anton et al., 2018).

El estudio evolutivo del exómero y sus interacciones tanto con los cargos como con el complejo AP-1, han permitido revelar parte de los detalles de un ejemplo 'vivo' de la hipótesis de los parálogos en la formación de los orgánulos de origen no endosimbionte. Así, el análisis evolutivo de las relaciones entre proteínas cargo y los múltiples complejos proteicos constituye una potente herramienta para el entendimiento del transporte intracelular en las distintas especies actuales de eucariotas.

5. LA FUNCIÓN ANCESTRAL DEL EXÓMERO

Como se comentó en la introducción, se ha discutido mucho sobre qué es el complejo del exómero y qué función concreta lleva a cabo. Aunque ya se había descrito en detalle la estructura y la mecánica de reclutamiento del complejo (Huranova et al., 2016; Paczkowski et al., 2015), su papel en diversos aspectos biológicos estaba aún por explorar. En los últimos años se han obtenido evidencias que dibujan al exómero como un complejo mucho más polivalente de lo que se pensaba en el tráfico intracelular proteico (Anton et al., 2017, 2018; Hoya et al., 2017; resultados no publicados, S. Moro y H. Valdivieso). Además, las últimas evidencias avalan la hipótesis de que la función de adaptador de cargo descrita para el exómero no sería una función conservada, sino una especialización a partir de un exómero con otra función potencialmente conservada a lo largo del clado Fungi. Esta especialización tuvo lugar sobre un exómero primordial gracias a la duplicación y posterior noefuncionalización de los ChAPs. Teniendo en cuenta esta especialización como adaptador de cargo, surge una importante pregunta en la búsqueda de la supuesta función conservada del exómero. ¿Qué tipo de función pudiera desarrollar el exómero que pudiera explicar los fenotipos tan dispares descritos en los últimos años así como posibilitar una especialización como adaptador de cargo?

Probablemente, parte de la respuesta reside en la localización subcelular que presenta el complejo. Así, el exómero se recluta a las membranas del TGN/EE, un orgánulo polivalente por el cual transcurren las proteínas con dominios transmembrana en su camino hasta su compartimento destino. Independientemente de la naturaleza de la función conservada, si este exómero primordial residía en dichas membranas, estaría en permanente contacto con los dominios citosólicos de las proteínas transmembranas así como con otros complejos con función en el tráfico proteico. Por lo tanto, es factible que una co-evolución de todos estos elementos pueda generar una situación en la que el transporte de la proteína transmembrana tenga una fuerte dependencia por uno de los complejos, en este caso el exómero, recibiendo este último la denominación de adaptador de cargo para dicha proteína. En cuanto a los nuevos fenotipos descritos para los mutantes del exómero en múltiples especies, una función básica del exómero en el TGN/EE también podría ser la causa de todos ellos. Teniendo en cuenta que la visión actual del TGN/EE es la de un compartimento donde llegan, se segregan y se envían proteínas desde/hacia múltiples destinos celulares (Day et al., 2018), si el exómero desarrollase una función en dicho compartimento, proteínas con destinos dispares podrían verse alteradas en ausencia del exómero.

Por lo tanto, la función conservada del exómero pudiera ser la de hacer de plataforma molecular en el TGN/EE que de forma directa o indirecta participase en la localización final de diferentes proteínas con dominios transmembrana. De este modo, como catalizador de la actividad deformadora de membranas de Arf1 (Paczkowski and Fromme, 2014), su ausencia pudiera alterar la segregación proteica que tiene lugar en el TGN/EE. Sin ser excluyente, otra posibilidad sería que el exómero permitiese la correcta disposición de las modificaciones post-traduccionales en las proteínas transmembrana. Como plataforma capaz de interactuar con los dominios citosólicos de proteínas transmembrana (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Sanchatjate and Schekman, 2006; Weiskoff and Fromme, 2014), el exómero pudiera permitir el reclutamiento de la maquinaria de fosforilación y/o ubiquitinación. En esta línea, se han descrito numerosas modificaciones post-traduccionales en las proteínas cuyo transporte depende del exómero (Arcones et al., 2016; Ren

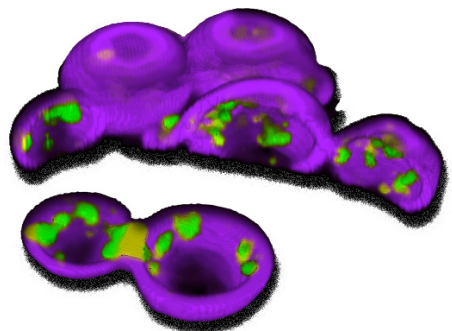
et al., 2008; Ritz et al., 2014; Sacristan et al., 2013; Swaney et al., 2013; Trueheart and Fink, 1989).

Aunque hasta el momento no se ha descrito un mecanismo molecular conservado para el exómero, la mayor parte de los fenotipos observados tienen un denominador común, la respuesta a estrés celular. Así, proteínas cuyo transporte depende del exómero, como Chs3 y Ena1, tienen un papel en respuesta a estrés agudo (Ariño et al., 2010; Valdivia and Schekman, 2003). Ante diferentes tipos de estrés la célula necesita de una re-localización precisa de lípidos y proteínas, lo cual probablemente implique modificaciones post-traduccionales y un transporte acelerado y preciso, ambos requerimientos en los que el exómero pudiera desarrollar un papel activo en el TGN/EE.

Sorprendentemente, hasta la fecha solo unos pocos fenotipos están conservados entre los mutantes del exómero de diferentes especies. ¿Cómo puede ser esto posible? La diferente relevancia del exómero en cada organismo, así como su implicación en unas rutas de transporte o en otras, dependerá de la co-evolución que haya sufrido con otros complejos y proteínas transmembrana del TGN/EE en el desarrollo de cada especie. Además, hay que tener en cuenta que sus funciones pueden estar parcialmente solapadas por otros complejos, por lo que en la búsqueda de nuevas funciones es posible que solo se observen defectos en ausencia conjunta del exómero y otro complejo del TGN/EE. Únicamente, la hipersensibilidad a la rapamicina parece ser un elemento común entre los mutantes del exómero de diferentes especies (Anton et al., 2018). La rapamicina bloquea la función de TORC1, lo cual en definitiva supondrá un cambio global en la distribución proteica celular. Si el exómero tiene un papel conservado en el funcionamiento del TGN/EE, es lógico esperar que ante una situación tan brusca como esta, las cepas carentes del exómero muestren un tráfico proteico global alterado, y por lo tanto, una capacidad de respuesta adaptativa menor.

Los últimos estudios realizados en torno al complejo del exómero han permitido no solo generar información de su implicación en múltiples procesos, sino que también han permitido ahondar en las relaciones que tienen lugar entre la miscelánea de elementos que convergen en el TGN/EE y que median la segregación de proteínas hacia múltiples dominios celulares. Como ha ocurrido con el exómero y el complejo AP-1 en *S. cerevisiae*, y seguramente entre otros complejos en múltiples especies, el transporte de una proteína desde el TGN/EE es el resultado de interacciones que presenta con muchos complejos que allí convergen, en un preciso instante, y a lo largo de la evolución de dicha especie.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



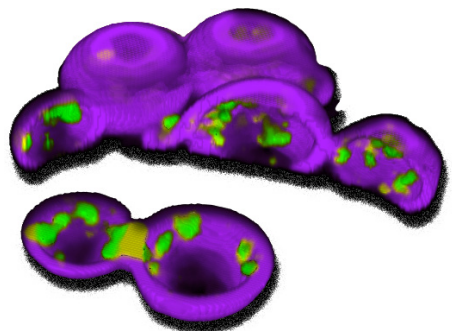
CONCLUSIONES

1. La hipersensibilidad de los mutantes del exómero de *S. cerevisiae* a metales alcalinos tóxicos es debida, al menos en parte, a su incapacidad para distribuir polarizadamente Ena1 a las regiones de crecimiento activo de la membrana plasmática.
2. La ruta RIM101 de *S. cerevisiae*, importante en la respuesta frente a agentes alcalinizantes, requiere del exómero para la correcta localización y función de su complejo sensor en las zonas corticales.
3. El exómero es un complejo proteico cuya función ha sufrido una especialización a lo largo de la evolución del clado Saccharomycotina, todo ello fruto de un doble proceso de duplicación y neofuncionalización de la subunidad ChAP.
4. La función del exómero como adaptador de carga parece exclusiva del género *Saccharomyces*, y tiene su origen en la neofuncionalización del exómero y la co-evolución del mismo con los cargos y otros adaptadores del compartimento TGN/EE.
5. Los datos recabados apoyan la existencia de un complejo exómero a lo largo del clado Fungi. Chs5 es una proteína exclusiva de los hongos, mientras que la proteína ChAP, aunque ausente en animales, está presente en múltiples linajes eucariotas, lo que parece indicar que es un elemento que estuvo presente en el último ancestro eucariota común (LECA).
6. El exómero está implicado en el metabolismo del nitrógeno a través de su papel en el tráfico intracelular de distintas permeasas de aminoácidos.
7. El exómero participa en la segregación de proteínas con dominios transmembrana a nivel del TGN/EE, y a diferencia de lo que se pensaba, tiene implicaciones en la distribución de proteínas hacia destinos distintos a las regiones de crecimiento activo de la membrana plasmática.

CONCLUSIONS

1. The hypersensitivity of the *S. cerevisiae* exomer mutants to toxic alkaline metals is at least partially due to its incapacity to distribute polarized Ena1 to the active growth regions at the plasma membrane.
2. The RIM101 pathway of *S. cerevisiae*, an important signaling cascade against alkalizing agents, requires the exomer complex for the proper location and function of its sensor complex at cortical PM regions.
3. The exomer is a protein complex whose function has suffered a functional specialization along the evolution of the Saccharomycotina clade, associated to a double gene duplication process and a neofunctionalization of the ChAP subunit.
4. The exomer function as cargo adaptor seems to be an exclusive characteristic of *Saccharomyces* genus which was originated by the exomer neofunctionalization and its co-evolution with protein cargoes and other cargo adaptors at TNG/EE compartment.
5. The data collected support the existence of an exomer complex along the Fungi clade. Chs5 would be a specific protein of Fungi, while the ChAP family of proteins, though absent in animals, is present in many eukaryotic lineages, which seems to indicate that it was already present in the Last Eukaryote Common Ancestor (LECA).
6. The exomer complex is involved in nitrogen metabolism through a role in intracellular trafficking of multiple amino acid permeases.
7. The exomer complex participates in the segregation of transmembrane proteins at TGN/EE and, contrary to what was thought, it plays a role in the distribution of proteins to destinations other than the active growth regions of the plasma membrane.

SUMMARY



1. Introduction

One of the major features of eukaryotic cells is the compartmentalization of the cytoplasm. Although some prokaryotes show a certain level of internal organization including membrane structures, in the eukaryotic cell the sophistication has reached an incomparable level that includes not only the endosymbiotic organelles but the organelle array of the endomembrane system, the flagellum and the nucleus (Rout and Field, 2017). The establishment of the endomembrane system represented a milestone in the transition from the prokaryotic to eukaryotic cellular configuration. Indeed, it has enhanced the ability to quickly remodel its cell surface, secrete proteins to modify the environment, and acquire nutrients by endocytosis or even phagocytosis of other organisms. In addition, the trafficking along these internal compartments has allowed the sequestration of metabolic processes, considerably increasing the efficiency of the enzymatic reactions. Even more, it has been proposed that the subcellular compartmentalization could have served to integrate the fledgling endosymbiotic interactions (Schlacht et al., 2014).

In this context, specialized transport mechanisms are required to direct molecules to specific compartments and to ensure that the identity and function of individual compartments are maintained. Proteins constitute the main, but not the only molecule of this trafficking system. These contain structural information that targets them to their correct destination. Membrane transport pathways have traditionally been divided into the secretory pathway and the endocytic pathway. However, it is now clear that intracellular membrane transport pathways are a complex network with multiple contacts (Derby and Gleeson, 2007).

In protein trafficking, probably the most important element is the transmembrane proteins. Those are able to integrate signals from the cytoplasm as from the organelle lumen. Indeed, the transport of soluble proteins of the lumen depends on the interaction with the membrane, which sometimes is mediated through a transmembrane receptor. Transmembrane proteins are regularly sorted into membrane intermediaries or vesicles for their transport through the secretory and endocytic pathways by the action of dedicated cargo adaptors (Bonifacino and Glick, 2004; De Matteis and Luini, 2008; Schekman and Orci, 1996). These protein cargo adaptors not only direct cargo loading but perform additional functions in vesicle biogenesis, including recruitment and the stabilization of other coat components (Bonifacino and Lippincott-Schwartz, 2003; Duncan and Payne, 2003; Spang, 2008).

In the secretory pathway, newly synthesized proteins destined to plasma membrane (PM) or endosome compartments suffer post-translational modifications through the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi Apparatus up to reach the main delivery station, the *trans*-Golgi network (TGN). There, proteins will be classified and segregated in different domains where proteins will be launched to diverse compartments by different membranous transport carriers. To manage this authentic crossroads, cells have numerous cargo adaptors that recognize different kinds of signals at cytoplasmic domains of transmembrane proteins. These specific interactions and the competence between cargo adaptors to recognize the signals affect the final distribution of the cell proteome (Bard and Malhotra, 2006; Bonifacino, 2014; Spang, 2015) (**Figure 1**).

Focusing on PM proteins, once the protein has reached its final destination, it develops its function and, in a variable ratio, it suffers endocytosis to endosomal compartments. There, proteins

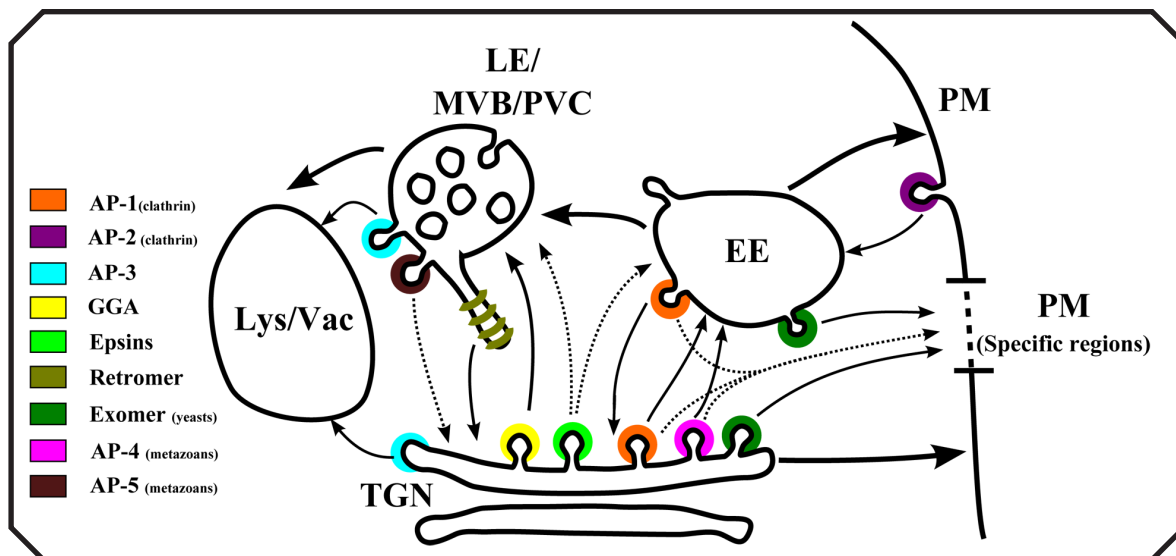


Figure 1: Adaptor complexes and coats at *trans*-Golgi network. Representation of main coats and adaptor complexes in *trans*-Golgi network of metazoans and yeasts. Lineage specific adaptors and those which use clathrin coats are indicated in the legend on the left. The arrows indicate the direction of transport in which they are involved. The variety of alternatives of transport between TGN, endosomes, and PM can be seen. Notes: dashed arrows denote a transport with less evidence than the continuous one, and large arrows refer to the existence of an alternative adaptor-independent transport. Note that in yeast, exomer complex mediates transport to specific PM regions like AP-1 and AP-4 do in metazoans in some cases. TGN, *trans*-Golgi network; MVB, multivesicular body; LE, late endosome; PVC, pre-vacuolar compartment; Lys, lysosome; Vac, vacuole; PM, plasma membrane.

can undergo different processes. They can be recycled, directly or indirectly through the TGN, to the PM or they can be sent to the lysosome/vacuole for degradation (MacDonald and Piper, 2016). Depending on the organism, this delivery to the PM and recycling can be done in a variable number of organelles. In the model organism *Saccharomyces cerevisiae*, it has been recently described that the delivery to the PM and the recycling process occur in the same compartment (Day et al., 2018). Therefore, this compartment with characteristics of TGN and early endosome (EE) constitutes a physical connection between secretory and endocytic pathways. This fact entails that at the same location a huge amount of different protein complexes, including cargo adaptors, acts to define the final protein distribution.

In this context, very limited mechanistic data are available concerning cargo sorting at TGN/EE to the PM (Bard and Malhotra, 2006; Bonifacino, 2014). In *S. cerevisiae*, such secretory vesicles are the main source of lipids and proteins used to generate the PM of a daughter cell (Drubin and Nelson, 1996). However, the mechanisms involved in the biogenesis of these secretory vesicles, as well as the mechanisms for cargo sorting, have long remained elusive. The analysis of the exomer complex provided some mechanistic understanding of TGN/EE sorting in *S. cerevisiae* (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Exomer serves as a kind of sorting platform at the TGN/EE for the delivery of a very limited number of proteins to the PM: Chs3, Fus1 and Pin2 (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Trautwein et al., 2006).

Exomer complex is an effector of TGN/EE GTPase Arf1 (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Structurally, it consists of two copies of the main subunit Chs5 and two copies of any member of four paralogue proteins known as ChAPs (Chs5 and Arf1

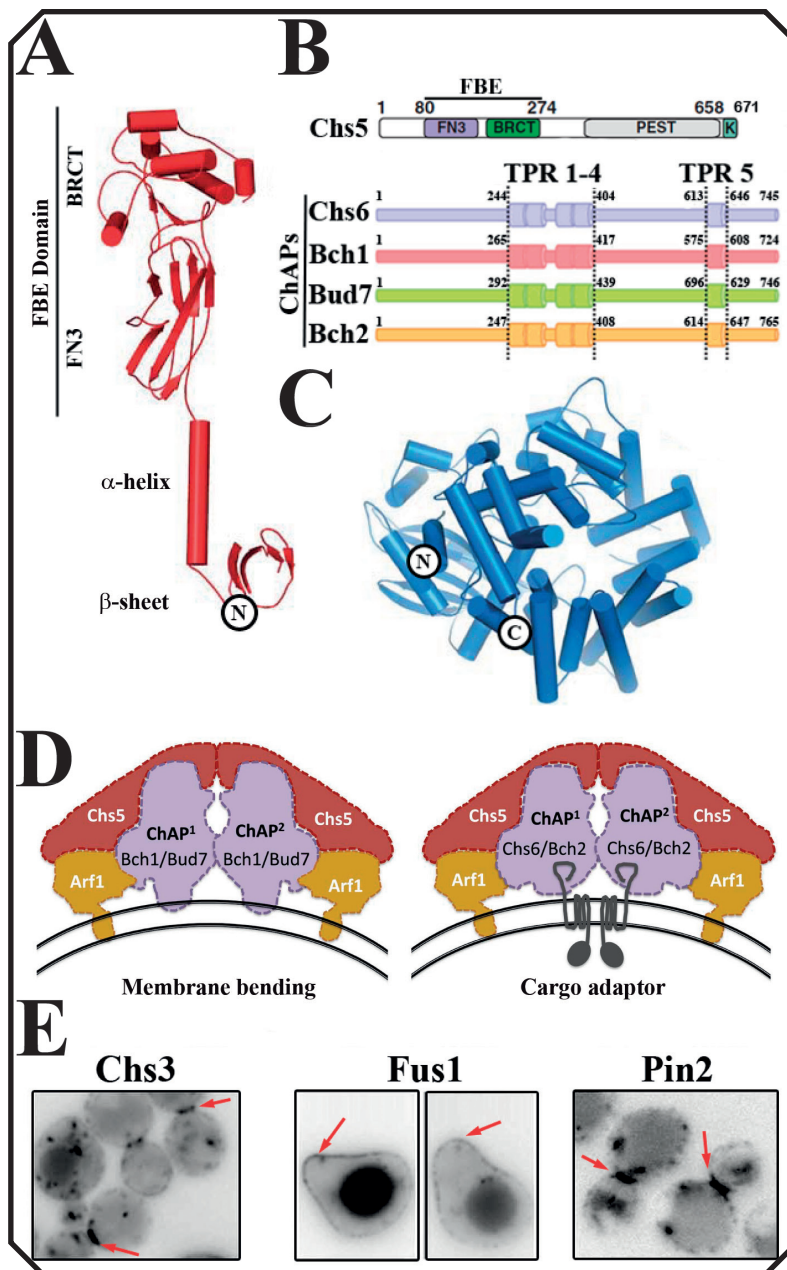


Figure II: The exomer complex in *S. cerevisiae*. **A)** 3D representation of the 300 first amino acids of Chs5 (Paczkowski et al., 2012). **B)** Scheme of the linear sequence and domains of Chs5 and ChAPs (Paczkowski et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012). **C)** 3D representation of Chs6 ChAP (Paczkowski et al., 2012). **D)** Representation of exomer complex recruited to TGN/EE membranes and interacting with 2 subunits of Arf1. Figure on the right represents an exomer with Bch2/Chs6 ChAPs, which mediates cargo adaptor functions. Figure on the left represents exomer with Bch1/Bud7 ChAPs, the one able to bend membranes together with Arf1. **E)** Fluorescent microscopy images of *bona fide* exomer cargoes. Note: Fus1 is only expressed in mating and it localizes at the cell tip.

binding proteins): Chs6, Bud7, Bch1 and Bch2 (Paczkowski et al., 2012) (**Figure IIB**). Chs5 presents a specific N-terminal region which is only present in its homologues and it is able to mediate the main functions of Chs5 by itself (Martín-García et al., 2011). In the N-terminal edge, it presents an anti-parallel β -sheet continued by a single α -helix which connects with the FBE domain. It is composed of a FN3 domain (FibroNectin type III) and a BRCT domain (Breast Cancer C-Terminal) (**Figure IIA and B**). ChAPs present 5 tetratricopeptide domains (TPRs), a domain which is present in other proteins and which is important in protein-protein interactions (Rockenbauch et al., 2012). 4 TPRs are located in the central region, which is important for Chs5-ChAP interaction, and 1 in the C-terminus, an important region for the ChAPs recruitment to the TGN/EE (Rockenbauch et al., 2012) (**Figure IIB and C**). Two Chs5 molecules interact through the N-terminal edge making up a β -sandwich structure (Richardson and Fromme, 2013), and through the FBE domain this

homodimer recruits 2 ChAP proteins and interact with 2 molecules of Arf1 (Paczkowski et al., 2012; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006) (**Figure IID**). The subunits are sequentially recruited to the TGN/EE membranes, showing distinct ability between ChAPs to stabilize the complex (Huranova et al., 2016). Functionally, two types of exomer complex can be distinguished, one with the ChAPs Bch1/Bud7, which is able to remodel membranes (Paczkowski and Fromme, 2014), and the other with Bch2/Chs6, which develops cargo adaptor-like functions (Huranova et al., 2016; Paczkowski and Fromme, 2014).

Only 3 proteins whose transport to the PM is completely exomer-dependent have been described: the chitin synthase Chs3 (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006), the mating protein Fus1 (Barfield et al., 2009), and Pin2, a protein with unknown function and a prion-like domain (Ritz et al., 2014) (**Figure IIE**). In the absence of exomer these proteins are fully retained at TGN/EE boundary. Unfortunately, there are no descriptions of any structure or specific signal recognized by the exomer complex. Chs3 interacts through its C and N- terminus with the exomer (Rockenbauch et al., 2012; Weiskoff and Fromme, 2014), Fus1 contains a specific signal recognized by the exomer but not shared among the rest of cargoes (Barfield et al., 2009), and Pin2 does it through its C-terminus (Ritz et al., 2014). Despite this situation, all of these cargoes share a characteristic polarized distribution at the PM. In addition, all of them show post-translational modifications, and at least Chs3 and Pin2 display a strong post-translational regulation which generates a regulated cycling of the protein between PM and TGN/EE (Arcones et al., 2016; Chuang and Schekman, 1996; Ritz et al., 2014; Sacristan et al., 2013; Zanolari et al., 2011). Surprisingly, in the absence of adaptor complex AP-1 (Barfield et al., 2009; Ritz et al., 2014; Valdivia et al., 2002) or when the interaction among AP-1 and the cargo is inhibited (Starr et al., 2012), any of the exomer cargoes are able to reach the PM independently of the exomer through an alternative pathway. However, at these conditions, their location at the PM loses the strong polarization.

2. Results and Discussion

2.1. Chapter 1: Exomer complex implications in the cationic metabolism

An intriguing unresolved issue regarding exomer function is the fact that exomer deficient mutants are highly sensitive to lithium, sodium, ammonium, or hygromycin (Fell et al., 2011; Ritz et al., 2014; Trautwein et al., 2006). These phenotypes cannot be explained by defective transport of any of the previously described exomer cargoes, including Pin2, which is rapidly endocytosed under hyperosmotic condition but whose deletion displays no increased Li⁺ sensitivity (Ritz et al., 2014). All of the above substances are cationic molecules whose cytotoxicity is mediated when they are cumulated at intracellular level. Therefore, the toxicity depends on the permeability of the PM for these compounds, and this is regulated by several PM transporters. Alkali-metal cation uptake depends mostly on the activity of Trk1/2 potassium uniporters, while efflux relies on the activity of the potassium channel Tok1, the cation-proton antiporter Nha1, and the cation ATPase Ena1-4 (review in Ariño et al., 2010). The regulation of such transporters is complex, and positive and negative regulators have been described. Several *HAL* (for halotolerance) gene products have been shown to act as positive regulators of these transporters, including Hal1 (Rios et al., 1997), Hal3 (de Nadal et al., 1998), and the Ser/Thr kinases Hal4 and Hal5 (Mulet et al., 1999). In contrast, Hal2 is

involved in halotolerance as a direct target of sodium toxicity (Murguía et al., 1996). The activity of the protein phosphatases Ppz1/2 negatively regulates the potassium uptake mediated by Trk1/2 and the Na⁺/Li⁺ efflux mediated by Ena1-4, thus being negative regulators of halotolerance (Yenush et al., 2002). Moreover, in the regulation of such transporters several signal transduction pathways also converge, including the calcineurin- and RIM101-dependent responses (Ariño et al., 2010).

Based on these premises, in a joint effort with the laboratories of Professors Anne Spang and José Miguel Mulet, we decided to analyze the molecular causes inherent to the phenotypes of hypersensitivity to cations showed by exomer mutants.

Ena1 polarized transport depends on functional exomer complex

The first hint about exomer implication on cationic channels function came from the comparison between exomer and cation channels null mutants exposed to Na⁺, Li⁺ and hygromycin. The *ena1-4Δ* mutant in which the cluster containing the four ENA genes was deleted (Yenush et al., 2002) showed a sensitization similar to *chs5Δ* exomer mutant (not shown). To gain a better understanding of the molecular implications, we searched for multi-copy suppressors of the Li⁺ sensitivity of the *chs5Δ* mutant by selecting colonies that were able to grow on plates containing 0.2 M Li⁺. This experiment revealed a link between exomer and HAL gene products. In fact, the overexpression of HAL1, 3, 4 and 5 alleviate the hypersensitivity of *chs5Δ* mutant to Na⁺ and Li⁺ (not shown). Taking into account that these gene products are implicated in the regulation of PM channels function, we decided to analyze directly the overexpression of these channels in a *chs5Δ* mutant. Out of the six candidates tested (*ENA1*, *TRK1*, *KHA1*, *NHX1*, *NHA1*, and *QDR2*), only overexpression of *ENA1* and *QDR2* improved growth of *chs5Δ* on Li⁺ or Na⁺-supplemented plates (**Figure III A**). Ena1 and Qdr2 are both extrusion pumps. Therefore, the sensitivity of *chs5Δ* to cations is probably linked to a defect in extrusion of the toxic ions rather than to an influx defect. To test this notion, we measured Li⁺ extrusion in both wild-type and *chs5Δ* strains (**Figure III B**), resulting in a clearly reduced export of Li⁺ in the *chs5Δ* mutant. In contrast to *ena1-4Δ*, *qdr2Δ* is neither Li⁺ nor Na⁺ sensitive (Ríos et al., 2013). Therefore, only Ena1-4 dysfunction could explain the Na⁺/Li⁺ hypersensitivity of exomer mutants.

Exomer complex is involved in the transport of some PM proteins, thus it is conceivable that Ena1 PM transport, as transmembrane protein, could depend on exomer complex. *ENA1* expression is under strong transcriptional control (see Ariño et al., 2010 for a review). Therefore, to avoid any possible implication of exomer in *ENA1* expression, we investigated Ena1-GFP under the inducible promotor tetO (Marqués et al., 2015). In this system, Ena1-GFP expression was regulated in a doxycycline (dox) concentration-dependent manner, in which 10μg/ml abolished Ena1-GFP expression and 0.1μg/ml allowed some expression. We analyzed the Ena1-GFP distribution not only at both doxycycline concentration but also with or without Na⁺/Li⁺ treatment because this induces Ena1 PM polarization (**Figure III C**). The polarization level was quantified measuring the signal coefficient daughter/mother cell (**Figure III D**). At every situation, the polarization was reduced in the *chs5Δ* mutant. Consequently, exomer complex has a direct role in the transport of Ena1.

We hypothesize that for Ena1 to act as cation detoxifier it needs to be localized to the bud in order to protect the growing bud. The bud is particularly sensitive to any insult, such as Li⁺/Na⁺ stress, because the cell wall in this area is less rigid and less complex than in the mother. As a consequence, the effects of the alkali metals in cell integrity may be more severe in the bud than in the mother. And consequently, a reduced polarization of Ena1 could explain the hypersensitivity of

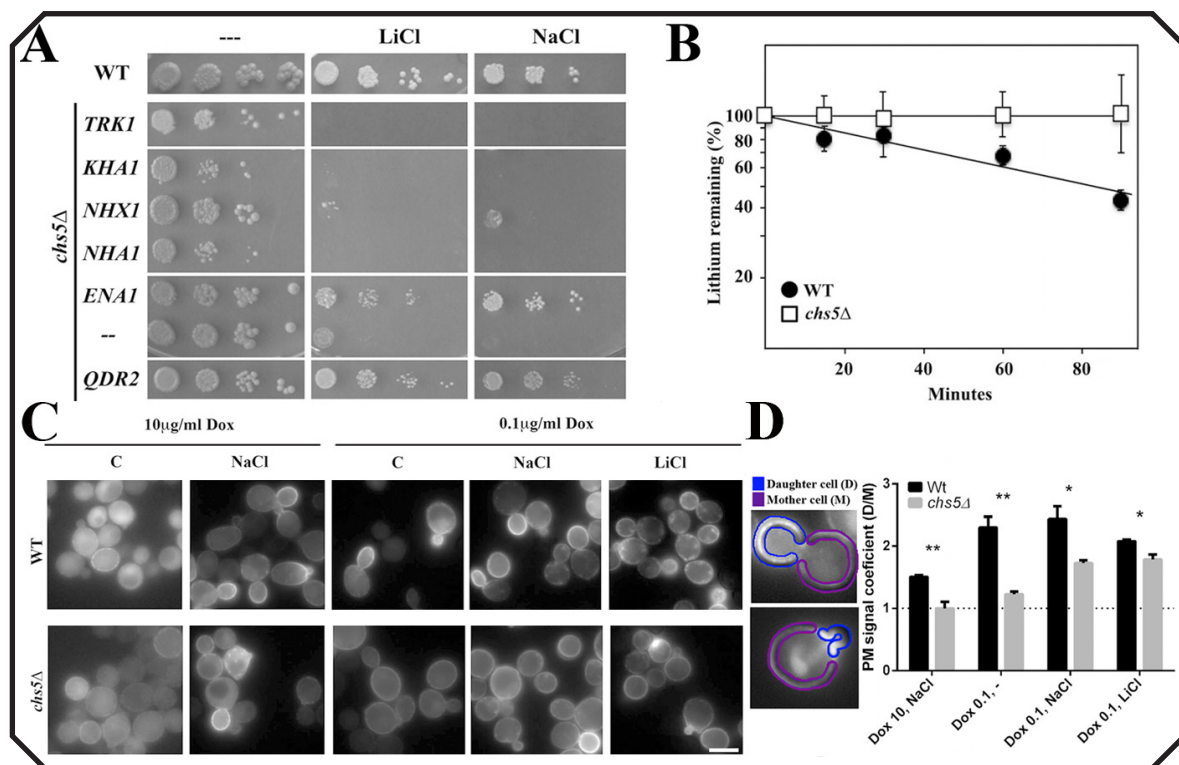


Figure III: Ena1 polarized transport depends on exomer complex. A) *chs5Δ* cells were transformed with the indicated genes expressed from multicopy plasmids, grown on selective SD media to 2×10^7 cells/ml, serially diluted and spotted onto the plates. Growth was scored after 2 d at 30°C. **B)** Li^+ extrusion in the indicated strains. Cells were preloaded with Li^+ and transferred to fresh media. Cells were collected at the indicated times, and the internal amounts of Li^+ were measured by atomic absorption. Data are presented as the percentage of the original values of the strain at 0 time. The results are the average of three independent cultures. **C)** Ena1-GFP expressed from the tetO promoter was visualized by fluorescence microscopy after growth on the indicated dox concentration for 2 hrs. Cation treatment was performed for additional 30 min. **D)** Panel on the left represents the measured area to obtain the Daughter/Mother Polarization Coefficient of Ena1-GFP. Graphic represents the average of this coefficient from 3 independent experiments. Dashed line represents null polarization ($D/M = 1$). Dox, doxycycline.

exomer mutants to toxic cations.

The assembly of RIM101 pathway sensor depends on exomer complex

The analysis of Ena1-GFP endogenous expression uncovered not only an altered transport in the exomer mutant as we show under the tetO promoter but also a reduced gene expression. In fact, Qdr2 protein levels were also increased in *chs5Δ* strain, a situation which is similar to *rim101Δ* mutant (Lamb and Mitchell, 2003). Under alkalization of the medium, the RIM101 cascade is activated to finally promote the proteolytic processing of a transcriptional repressor, Rim101 (Obara and Kihara, 2014; Peñalva et al., 2014). At neutral-alkaline pH, Rim101 is processed in the wild-type strain but not in the *chs5Δ* mutant (**Figure IV A**). Accordingly, the mutants of the RIM101 pathway share many phenotypes of sensitivity to cationic stress or alkaline pH with *chs5Δ* (**Figure IV B**) (results not shown). The signal is recognized by a PM sensor composed of Rim21, Dfg16 and Rim9 proteins, which recruits several other proteins to the surrounding area including the protease Rim13. The pH shift-dependent recruitment of Rim13 is altered in the exomer mutant (**Figure IV C**). In addition, we demonstrated that all of these alterations were caused by an aberrant assembly

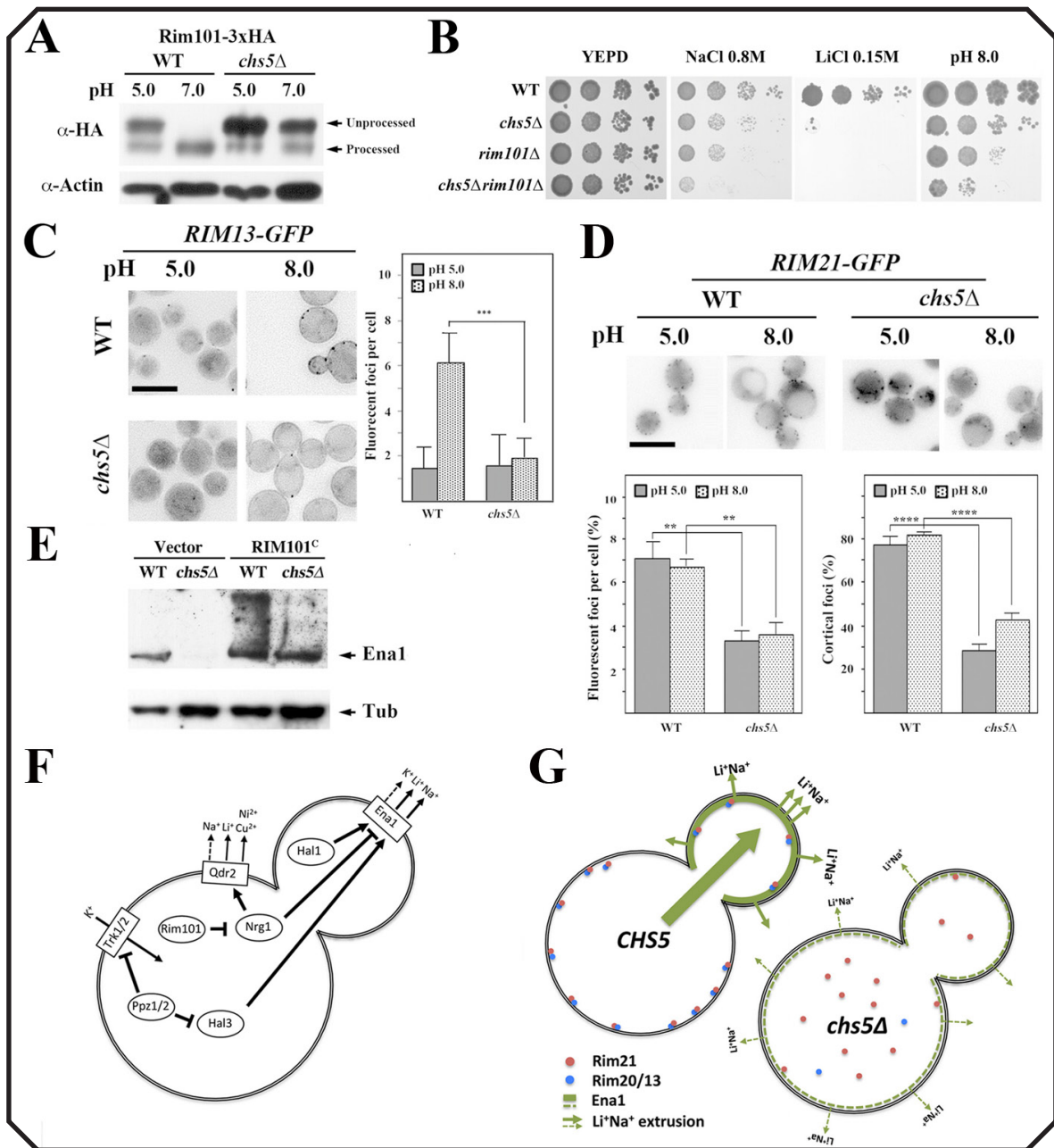


Figure IV: Defective RIM101 signaling in the exomer mutant and Chapter Scheme Summary. **A)** Immunoblot of Rim101 proteolytic processing at the indicated pH. Cells contain a modified version of Rim101 with an internal 3xHA tag. Note the absence of processing in the *chs5Δ* mutant compared with the control. **B)** Comparative phenotypes of *rim101Δ* and *chs5Δ* mutants. Logarithmic cultures were spotted onto YEPD media. Note the similar phenotypes observed and the additive effect of both mutations. **C)** Visualization of processing spots using yeast cells containing chromosomally tagged version of Rim13. Note the increasing numbers of spots after alkalization of the media for 1 h in wild type, which is absent in the *chs5Δ* mutant. Panel on the right shows the quantitative results. **D)** Rim21-x2GFP localization in the indicated strains/conditions. Note the lower cortical localization of the protein in the *chs5Δ* mutant independently of the media pH. Down panels represent the quantification of the spots number and distribution. All quantitative results are the average of at least three independent experiments. **E)** Levels of Ena1-GFP from its endogenous locus after expression of the constitutively processed Rim101^C from the pRS315 plasmid. Cells were grown O/N in selective SD media and refreshed in YEPD media for 2 h. **F)** Simplified scheme of the control of alkali metal cation transport across the PM in *S. cerevisiae*. **G)** Exomer controls alkali metal cation sensitivity by directly controlling Ena1 polarization and indirectly controlling Ena1 levels through the activation of the RIM101 signaling pathway.

of the sensor protein complex (**Figure IV D**) (and results not shown). Actually, the Ena1 levels were restored when a Rim101 already processed version (Rim101^c) was expressed in the *chs5Δ* mutant (**Figure IV E**).

Therefore, Ena1 detoxification function is altered in the exomer mutant through two different ways. On the one hand, an impaired RIM101 pathway avoids the Rim101 processing. The absence of processed Rim101 promotes a hyperactivation of Nrg1 which in turn reduces the *ENA1* expression (**Figure IV F**). On the other hand, the absence of exomer reduces the polarized distribution of Ena1 at PM (**Figure IV G**). Both situations make the cell not to be able to manage correctly with cationic stress or alkaline pH.

2.2. Chapter 2: The exomer complex in evolutionary context

As it was described in the introduction, every ChAP subunit has some kind of specificity. For instance, Bch1 and Bud7 are able to promote Arf1 membrane bending (Paczkowski and Fromme, 2014), while Chs6 acts as cargo adaptor for Chs3 (Paczkowski and Fromme, 2014; Rockenbauch et al., 2012). Although Bch2 has been suggested as a possible cargo adaptor for Pin2 (Ritz et al., 2014; and results not shown from Anne Spang laboratory), no more information was available about this particular ChAP.

Trying to increase the knowledge about the exomer subunits, we analyzed the effects of individual ChAP overexpression (**Table I**). This overexpression had not too many effects on the already described exomer phenotypes except in the case of *BCH2* overexpression, which promoted a moderate increase on ammonium chloride sensitivity and, more important, a block of Chs3 at TGN/EE with the concomitant increase in calcofluor resistance. We demonstrated that this was due to a specific displacement of Chs6 from TGN/EE membranes, and it depends on a specific C-terminal

Table 1. Effects of altering exomer configuration by deleting or overexpressing different ChAPs.

Strain	Growth ^a					Cargoes Localization ^b		
	CW	LiCl	NaCl	Hyg	NH ₄ Cl	Chs3	Fus1	Pin2
WT	-	++	++	++	++	+	+	+
<i>chs5Δ</i>	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>chs6Δ</i>	+++	++	+++*	NT	++	-	+	+
<i>bch2Δ</i>	-	++	+++*	NT	++	+	+	+
<i>bch1Δ</i>	-	++	NT	NT	++	+	+	+
<i>bud7Δ</i>	-	++	NT	NT	++	+	+	+
<i>chs6Δ bch2Δ</i>	+++	-	+	++	++	-	+	+
<i>bch1Δ bud7Δ</i>	+++	++	+	-	±	-	-	+
<i>pGAL-BCH1^{OE}</i>	-	++	++	++	++	+	+	+
<i>pGAL-BCH2^{OE}</i>	+++	++	++	++	+	-	+	+
<i>pGAL-BUD7^{OE}</i>	-	++	++	++	++	+	+	±
<i>pGAL-CHS6^{OE}</i>	-	++	++	++	++	+	+	+

*Data collected from previous reports (Ritz et al., 2014; Trautwein et al., 2006).

^aGrowth was assessed on YEP plates using glucose or galactose(OE) as carbon sources and defined as being from maximum (+++) to minimum (-).

^bLocalization was assessed microscopically using the tagged versions of the exomer cargoes Chs3-GFP, Fus1-GFP and Pin2-GFP expressed from their own promoters from centromeric plasmids or the chromosome. (+) indicates normal arrival of cargo at PM, while (-) indicates retention at the TGN/EE.

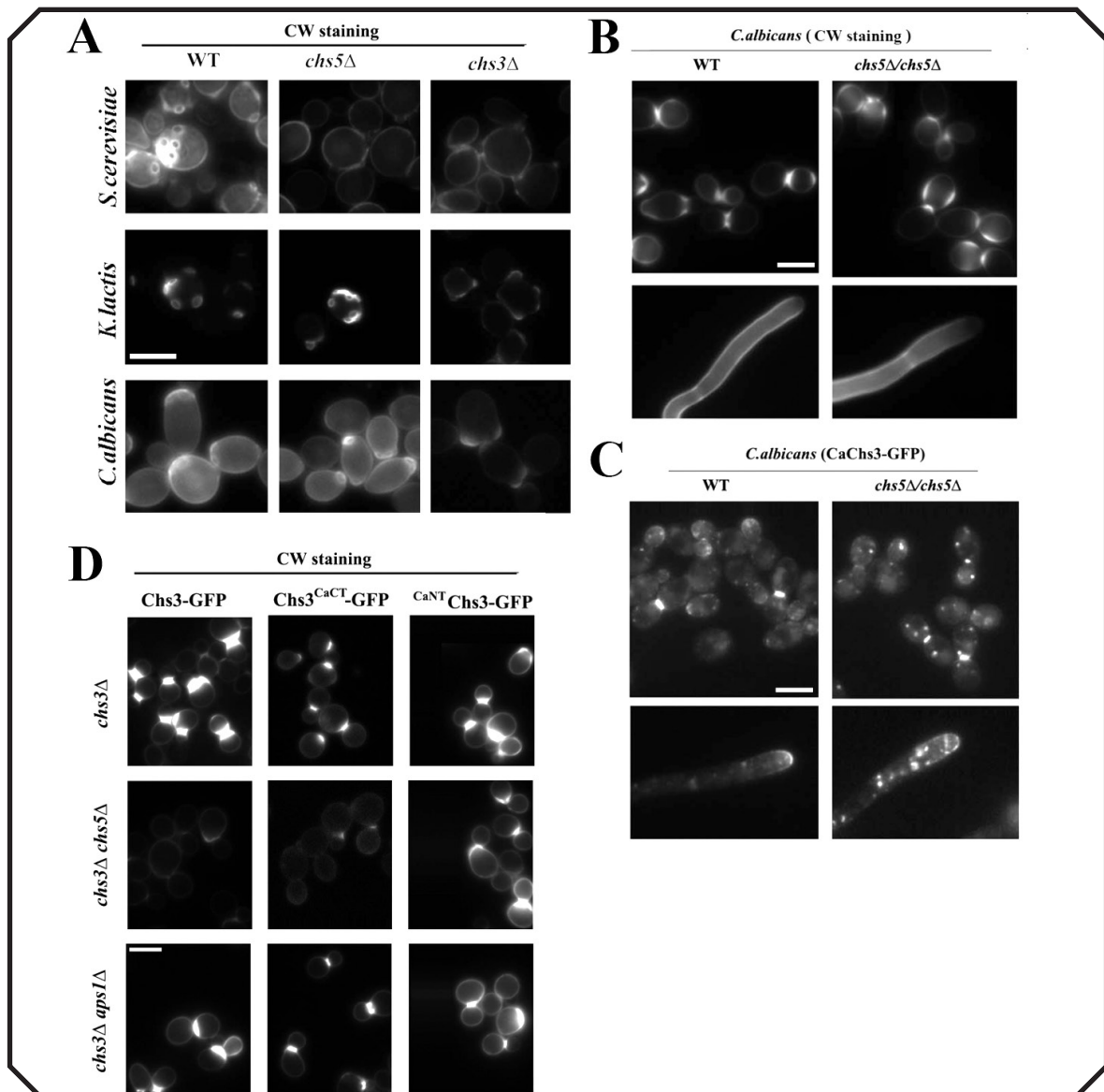


Figure V: Dependency of chitin synthesis for exomer complex in different species. A) CW staining of fixed cells on the indicated strains and organisms. Note the absence of chitin rings in all the *chs3*Δ mutants, which did not occur in the *chs5*Δ mutant, except in *S. cerevisiae*. **B)** CW vital staining of *C. albicans* yeast cells strains (upper panels). Staining was performed for 60 min. For hyphal visualization (lower panels), filamentation was induced for 2 hours and staining was performed on fixed cells. Note the different localization of chitin in the mutant in both yeast and hyphal cells. **C)** Intracellular localization of CaChs3-GFP on yeast and hyphal cultures. **D)** CW vital staining of the indicated strains expressing chimeric proteins Chs3^{CaCT}-GFP and ^{CaNT}Chs3-GFP, and wild-type ScChs3-GFP. CW, calcofluor.

region of Bch2 (result not shown). This circumstance is just a new example of ChAP specialization. Then, the question is if this functional specialization could be conserved in organisms with a reduced number of ChAPs.

Specialization of exomer complex as cargo adaptor in Saccharomycotina clade

The exomer has been described as a TGN/EE platform with protein cargo adaptor function because it mediates the transport from TGN/EE to PM of a restricted pool of proteins: Chs3, Fus1

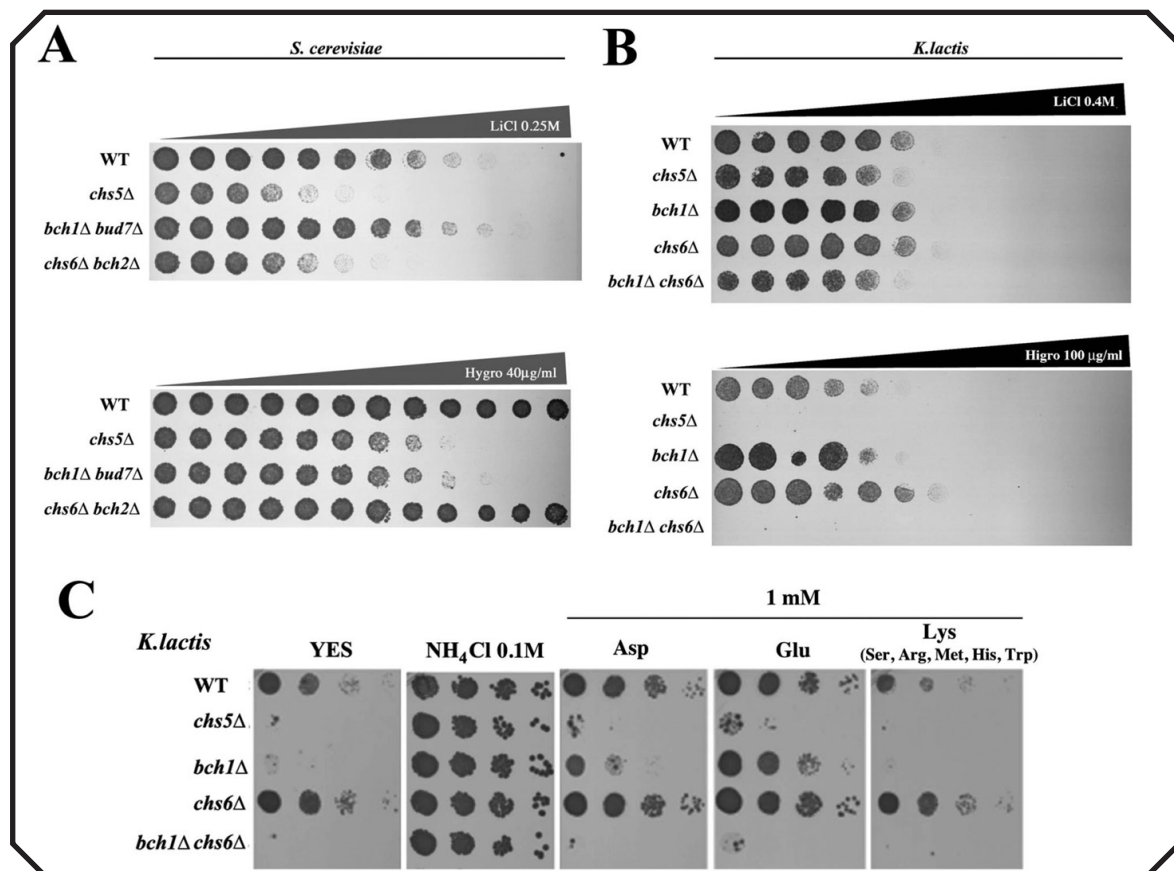


Figure VI: Functional specialization of ChAP families in *S. cerevisiae*. Growth of the indicated *S. cerevisiae* **A)** and *K. lactis* **B)** strains on YEPD gradient plates containing increasing concentrations of different compounds. Logarithmic cultures were diluted OD₆₀₀ 0.1 and spotted at identical concentrations along the gradient plate. **C)** Growth of the indicated *K. lactis* mutants on YES media supplemented with the indicated nitrogen sources. Panel on the right represents the plate supplemented with Lys, where the results with either amino acid were identical. In that case, early logarithmic phase cultures grown on YEPD were serially diluted and spotted onto the different plates. YEPD, 1% Bacto yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose; YES, yeast extract, glucose, and supplements.

and Pin2. We decided to analyze this function in other organisms. Among these exomer cargoes, only Chs3 is well conserved outside *Saccharomyces* genus. Surprisingly, the transport of Chs3 to the PM, in contrast to what happens in *S. cerevisiae*, does depend on exomer complex in *Ustilago maydis*, *Candida albicans* or *Kluyveromyces lactis* (**Figure V A**).

Despite that, further delving into the analysis of chitin synthesis in *C. albicans*, we observed that chitin deposition shows a loss of polarization under exomer absence (**Figure V B**). This is in consonance with the altered localization of Chs3 of *C. albicans* (CaChs3) in the *Cach5Δ* mutant: increased accumulation at TGN/EE compartments, absence of signal at incipient buds and a loss of the strong PM polarization in hyphae growth (**Figure V C**). Therefore, *C. albicans* exomer complex has a function in the transport of PM polarized proteins, but the question lies in how such a difference with *S. cerevisiae* can be explained. ScChs3 presents its N and C terminus projected to the cytoplasm, both regions mediating the interaction with exomer and AP-1 complexes. A specific signal at N-terminus is recognized by AP-1, and the last 37 amino acids (aa') are recognized for the exomer (Rockenbauch et al., 2012; Starr et al., 2012; Weiskoff and Fromme, 2014). Comparing the

sequence of the orthologues of ScChs3, including CaChs3, we found that these interacting regions are poorly conserved, something which could explain the different dependency of the cargo on the exomer. To support this idea, we expressed in *S. cerevisiae* hybrid proteins ScChs3/CaChs3 with the N-terminal or C-terminal regions of ScChs3 replaced by the same domain of CaChs3. The analysis of these constructions in the wild type strain and strains with exomer or AP-1 complex eliminated, *chs5* Δ or *aps1* Δ respectively, supported the idea of an exclusive specialization of the interaction between the ScChs3 and the exomer and AP-1 complexes mediated by its unique N and C terminal regions (**Figure V D**). Therefore, exomer complex seems to function as strict cargo adaptor complex only in *Saccharomyces* genus.

The specialization of exomer function in *S. cerevisiae* is not exclusive for cargo adaptor function. The strong sensitivity of exomer mutants to lithium chloride and hygromycin is conserved in *K. lactis* exomer mutants (**Figure VI A and B**). However, the specialization of the ChAPs branches for these phenotypes is only present in *S. cerevisiae*. In *S. cerevisiae* the absence of Bch1/Bud7 ChAP members promotes sensitivity to hygromycin and the absence of Bch2/Chs6 ChAPs to lithium chloride. In contrast, in *K. lactis*, an organism with only one protein per ChAP branch, KIBch1 and KIChs6, the absence of any ChAP branch is not linked to any phenotype. Therefore, the specialization of ChAPs for cation compounds took place latter to the separation between *kluyveromyces* and *Saccharomyces* genus. Another example is the inability of *K. lactis* exomer mutants to grow on YES medium, which was linked to a reduced capability to obtain external nitrogen sources (**Figure VI C**). For this phenotype it seems that Bch1 ChAP manages the main part of the function. However, the addition of aspartate or glutamate restores the growth of the *bch1* Δ mutant but not the growth of the double mutant *bch1* Δ *chs6* Δ . This indicates that Chs6 may have a partial contribution for this function and, therefore, there is partial redundancy between both ChAP branches in this species.

Outside Saccharomycotina clade there is only one ChAP while inside, due to two duplication events, the majority of the species present 2 o 4 ChAPs. These duplications have allowed the continuous specialization of the ChAPs up to the generation of new exomer functions in *S. cerevisiae*.

Evolutionary origin, distribution and conservation of exomer complex

Taking into account previous data, and in collaboration with the laboratories of Professors Joel B. Dacks and Anne Spang, we decided to analyze the evolutionary nature of the exomer and its subunits. To achieve that, we carried out an exhaustive analysis of homologue sequences *in silico* and a functional analysis *in vivo* with heterologous expression of Chs5 homologues in *S. cerevisiae*.

The deeper sequence analysis strongly supported our previous results about the ChAPs. A first ChAP duplication generated two ChAP branches in Saccharomycotina clade: the Bch1/Bud7 family (1 + 7 = **BB8**) and the Bch2/Chs6 family (2 + 6 = **BC8**). After that, the whole genome duplication, which took place just before the common ancestor between *S. cerevisiae* and *Candida glabrata*, generated 4 ChAPs. Comparing the sequences of *S. cerevisiae* ChAPs with sequences of ChAPs belonging to species outside Saccharomycotina, it was demonstrated that BC8 ChAP family has diverged more than BB8 family (**Figure VII A**). These analyses together with the assumption that sequence divergence reflects functional divergence, all suggest that the first gene duplication that gave rise to the BB8 and BC8 clades resulted in a neofunctionalization (acquisition of new functions) of the BC8 paralogues. The BB8 genes appear to be less diverged and thus are predicted to be more like the ancestral ChAP protein.

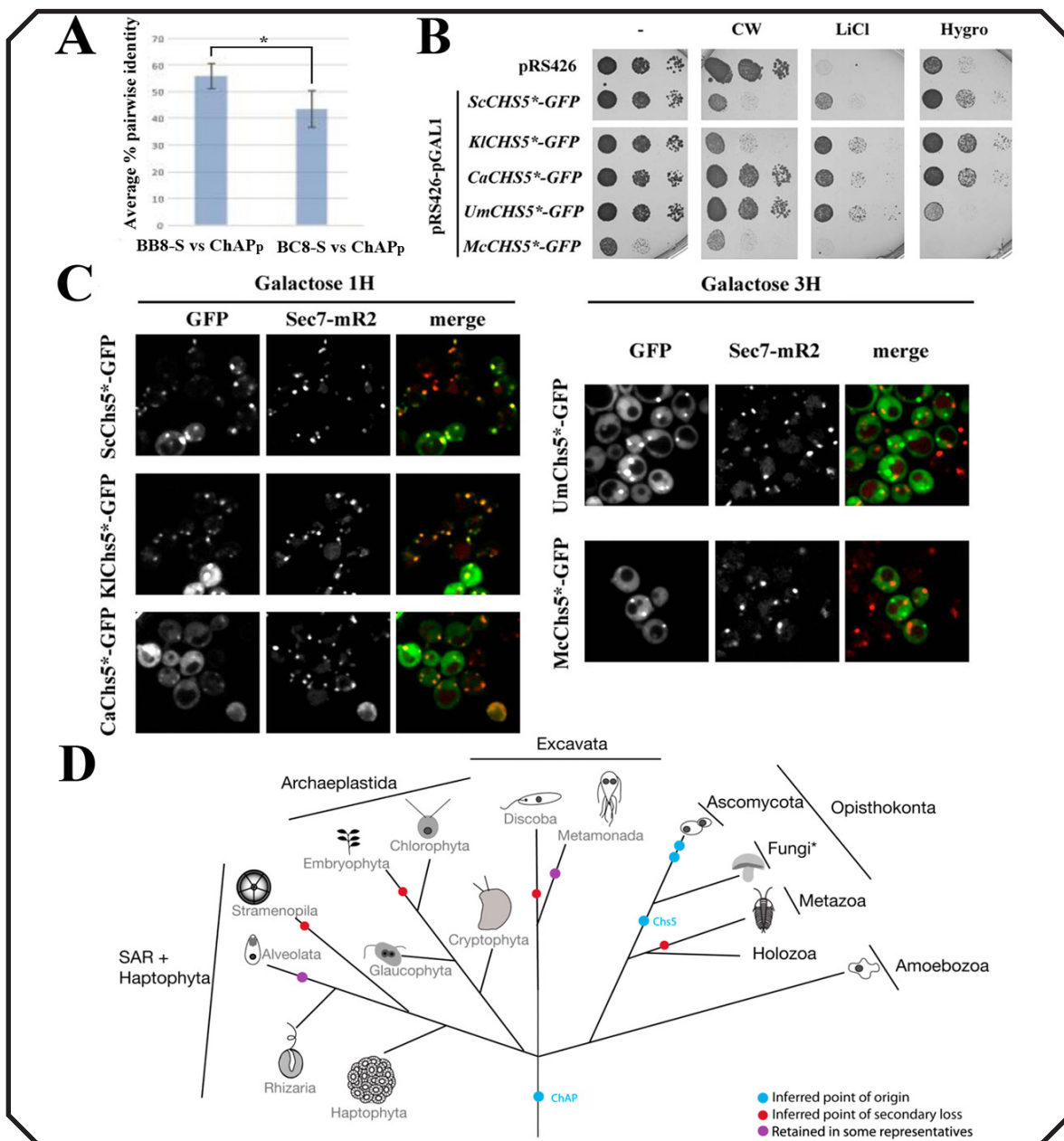


Figure VII: Evolutionary origin, distribution and conservation of exomer complex. **A)** Percent pairwise identities of ChAP proteins. Comparisons of ChAP genes of *Saccharomyces* genus of both ChAP families versus the preduplicate ChAP genes from non-ascomycete fungi. BB8-S, *Saccharomyces* ChAP genes of BB8 family; BC8-S, *Saccharomyces* ChAP genes of BC8 family. **B)** Complementation of the *chs5*Δ phenotypes by the heterologous expressed proteins from *S. cerevisiae* (ScChs5*), *K. lactis* (KlChs5*), *C. albicans* (CaChs5*), *U. maydis* (UmChs5*) and *M. circinelloides* (McChs5*). Overexpression of McChs5*-GFP showed deleterious effects on growth, therefore the complementation test is unreliable. All tests were performed in a *S. cerevisiae chs5*Δ strain grown overnight in raffinose media and later plated directly on galactose plates. **C)** Localization of N-terminal fragments of Chs5 tagged with GFP and co-localization of these fragments with the TGN marker Sec7-mRuby2. Images were acquired after induction in galactose media for the indicated times. **D)** Exomer component evolution across the tree of eukaryotes. The gains and losses of exomer components are mapped based on presence of at least two positive orthologues in a given taxonomic group. The purple circles indicate two instances where a single representative taxon possesses the ChAP protein despite multiple other representatives lacking the gene. The double blue circle in the ascomycetes denotes the ChAP duplications. The 'Fungi*' represents the paraphyletic assembly of Holomycota, with Ascomycota treated separately due to the additional evolutionary detail relating to exomer.

The phylogenetic distribution of the exomer subunits pointed to the existence of exomer complex in the majority of the fungal species. To get support for this idea, and taking into account the already described reduced conservation of phenotypes associated to exomer mutants among related species (Hoya et al., 2017; and results from this thesis), we decided to express heterologously the N-terminal half of Chs5 genes from several fungi, including the basidiomycete *Ustilago maydis* and the zygomycete *Mucor circinelloides* in *S. cerevisiae* cells deleted for *CHS5*, also taking into account that the N-terminal part of Chs5 (ScChs5*) is fully functional (Martín-García et al., 2011). We expressed these fragments fused to a GFP-tag and under the inducible PGAL1 promoter. Only the *K. lactis* fragment (KlChs5*) complemented all the *chs5Δ* associated phenotypes (**Figure VII B**) and co-localized neatly with TGN/EE (**Figure VII C**). *C. albicans* fragment (CaChs5*) was almost completely functional except for the calcofluor sensitivity. Outside Ascomycetes, the fragments accumulate at intracellular endosome-like dots. However, these dots do not colocalize with the TGN/EE marker Sec7. In addition, at least *U. maydis* fragment (UmChs5*) complemented the sensitivity to lithium *ScChs5Δ* mutant. These data point to an only partial functional conservation for the Chs5 orthologues outside Ascomycetes, something in consonance with the large evolutionary distance between these species, but which also points to the existence of a 'primitive' exomer complex with some characteristics shared with *S. cerevisiae* exomer complex.

ChAP protein seems to be a protein present in LECA (Last Eukaryote Common Ancestor), but it has been lost in several major groups. However, Chs5 is a characteristic of Fungi clade, which together with the ChAP probably constituted the exomer complex in a common ancestor to the major current Fungi groups. After that, two duplication events in the Ascomycota clade allowed for the strong specialization observed in *S. cerevisiae* (**Figure VII C**).

2.3. Chapter 3: Exomer complex implications in the nitrogen metabolism

The *chs5Δ* ammonium sensitivity is linked to tryptophan availability

The hypersensitivity of exomer mutants to ammonium excess (Rockenbauch et al., 2012; Trautwein et al., 2006) (**Table 1**) had already been described. However, until this thesis project, ammonium toxicity was considered another example of cation toxicity. On deeper analysis on this phenotype we realized that it was linked to the genetic background and the ability of yeast cells to synthesize tryptophan. Thus, *chs5Δ* exomer mutants made on genetics background with a mutation in *TRP1* gene such as W303 or YPH499 are sensitive to ammonium, while *chs5Δ* mutants made on backgrounds prototroph for tryptophan such as X2180 or BY4741 are insensitive to ammonium (not shown). To confirm this connection between the ammonium sensitivity of the exomer mutants and the tryptophan metabolism, we re-tested the ammonium sensitivity of W303 strains supplying with tryptophan, either adding it on the YEPD media or expressing *TRP1* gene in a centromeric plasmid (**Figure VIII A**). This and other experiments confirmed that *chs5Δ* ammonium toxicity points to a problem in the tryptophan uptake.

Considering the exomer antecedents, this phenotype could be linked to the block of any protein cargo at TGN/EE. It could be the case that a tryptophan permease might be retained in the *chs5Δ* mutant. In support of this idea, as it occurs with Chs3 transport and the concomitant calcofluor resistance, the double deletion of exomer and AP-1 complex reestablishes the wild-type phenotype, which could be signaling the aperture of an alternative route for the alleged cargo to the PM (**Figure VIII B**).

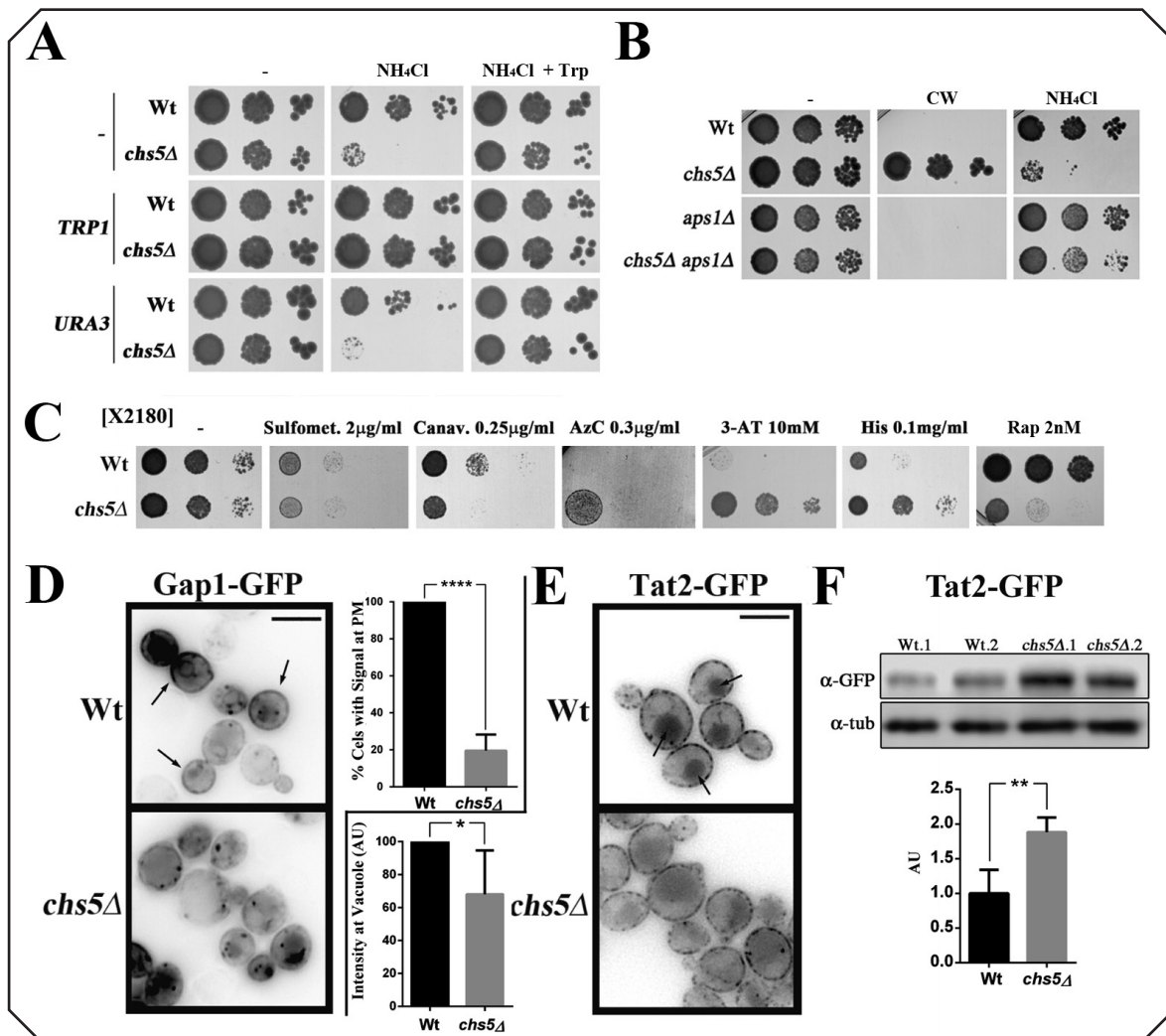


Figure VIII: Exomer complex implications in the nitrogen metabolism. **A)** Wild-type and *chs5Δ* cells constructed in W303-1A background were transformed with a centromeric plasmids with the indicated genes under their own promoter, grown on selective SD media, serially diluted and spotted onto YEPD plates. **B)** W303-1A strains plated on YEPD media with the indicated supplements. **C)** X2180-1A strains were spotted on YNB without aa' media (Dextrose 2%, YNB w/o aa' Difco 0.7%) and supplemented with the indicated compounds. **D)** Localization of Gap1-GFP expressed in a plasmid under PGAL1 promoter (YCp-PGAL1-GAP1-GFP-URA3). It was done in a media with proline as nitrogen source (YNb w/o ammonium sulphate and w/o aa' 1.9 g/L, proline 10 mM, raffinose 2 %, CMS - uracil, pH 6.2). After 2 hours of galactose induction, images were acquired. % of cells showing Gap1-GFP at PM was quantified and relativized to the wild-type. **E)** Localization of Tat2 chromosomally GFP-tagged. It was done in a regular SD media. Average vacuole GFP intensity was measured with ImageJ and relativized to the wild-type. **F)** Analysis of Tat2 total protein by western blot and quantification with ImageJ. All the experiments were repeated ≥ 3 times. NH_4Cl , 200 mM; Trp (tryptophan), 0.02 %; CW (calcofluor), 0.1 mg/ml; Sulfomet., sulfometuron methyl; Canav., L-canavanine; AzC, L-azetidin-2-carboxilate; 3-AT, 3-aminotriazole; His, L-histidine; Rap, rapamycin.

A role for exomer complex in the transport of amino acid permeases

These results around tryptophan metabolism made us wonder about possible implications of exomer in the whole nitrogen metabolism. To test this idea, we analyzed the sensitivity of *chs5Δ* mutant to multiple toxic aa derivatives and rapamycin. To simplify the interpretation of the results, we carried out the experiments with X2180 strains, which are able to produce all the aa'. In this

background, exomer mutant showed hypersensitivity to canavanine (toxic arginine analogue) and rapamycin, and showed resistance to AzC (toxic proline analogue), 3-AT (aa precursor able to block histidine production) and an excess of histidine (**Figure VIII C**). This confirmed a global nitrogen metabolism alteration for the exomer mutants.

With these data, we decided to test if the transport of any aa permease could be altered in the *chs5Δ* mutant. Probably, the most studied permease in *S. cerevisiae* is the general aa permease Gap1. This high-capacity permease mediates the uptake of all L-amino acids, and it is strongly regulated by the NCR (Nitrogen Catabolite Repression). Under preferred nitrogen sources such as ammonium or glutamate, NCR downregulates *GAP1* expression and promotes its degradation (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). To avoid this sophisticated regulation, we analyzed the localization of Gap1-GFP expressed in a centromeric plasmid under the inducible PGAL1 promoter (Kota and Ljungdahl, 2005) in a synthetic defined medium with proline as nitrogen source instead of ammonium. After 2 hours of expression, the majority of wild-type cells showed Gap1-GFP at PM, while in the *chs5Δ* mutant the localization in the PM was severely reduced, showing more accumulation at intracellular dots (**Figure VIII D**). In addition, we studied the localization of Tat2, which is a specific aa permease for tryptophan uptake. This is not regulated by the NCR but by the aa sensor SPS (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012). Thus, we could analyze its localization in a regular media such as YEPD or synthetic defined media based on ammonium. Surprisingly, the localization at the PM is similar in control and mutant strains, but the mutant shows less intensity at vacuole (**Figure VIII E**). This could be signaling a problem in protein degradation, something that was supported by western blot analysis: exomer mutant presents increased amounts in Tat2-GFP protein (**Figure VIII F**).

These results show that *chs5Δ* exomer mutant has altered the transport of aa permeases, which could explain the hypersensitivity or resistance to toxic aa derivatives. However, the impaired localization of Gap1 and Tat2 cannot explain directly the defect in tryptophan uptake since under high levels of ammonium Gap1 is repressed by NCR and Tat2 seems to reach the PM correctly. Therefore, the problem with the tryptophan has not been solved. Multiple possibilities can be explored, for instance, although Tat2 transport to PM is correct, a reduced functionality of the protein at the PM could be possible. Other possibility is that other permeases which mediate part of tryptophan uptake, such as Bap2, Bap3 or Tat1, could not be reaching the PM efficiently.

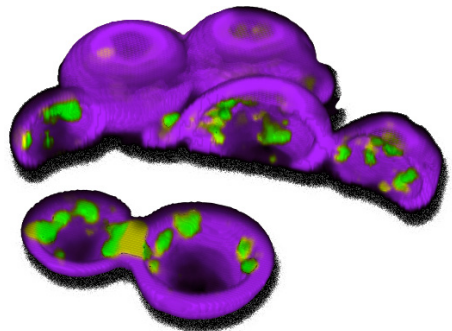
3. General discussion

The results presented here lead to question the previous functional model for exomer. Exomer complex has been considered a TGN/EE platform with cargo adaptor functions. Our results are not in opposition to this model, but strongly support new functions for exomer complex in protein transport. Our evolutionary studies have revealed a diversification of exomer ChAP subunits which has allowed exomer to acquire the function of adaptor complex in *S. cerevisiae*. In addition, the molecular implications of exomer in cation and nitrogen metabolisms support new functions for exomer. Therefore, exomer has probably more extensive functions on protein trafficking, and which are probably conserved in several species. This alleged conserved function, in a certain way, has allowed exomer to evolve in *S. cerevisiae* as cargo adaptor for a restricted pool of cargoes, probably an old-fashioned hallmark for exomer complex.

However, the question which needs an answer revolves around the nature of this alleged function. Here, we present several implications of the exomer complex in transport processes which differ from the classical polarized exomer transport to the PM. In contrast with the absolute block of Chs3, Fus1 or Pin2 at TGN/EE, Ena1 or Gap1 have their transport to PM moderately impaired in the exomer mutant *chs5Δ*. In addition, exomer is involved in the localization/transport of proteins to different locations such as cortical dots in the case of RIM101 sensor, or transport to vacuole in the case of Tat2. Thus, exomer is able to mediate multiple ways of transport from the TGN/EE, which is in consonance with exomer data obtained in *Schizosaccharomyces pombe* (Hoya et al., 2017). These authors argue for a collaboration of exomer complex with AP-1 and GGA in the transport to PM and late endosomes respectively. In *S. cerevisiae*, TGN/EE is a unique compartment where proteins from multiple locations, including Golgi or PM, arrive at, are segregated, and are sent to multiple destinies (Day et al., 2018). Therefore, it is feasible that exomer complex working at this location could be modulating the transport to multiple destinations. But then, what type of molecular function could be managing? Although our results do not provide an answer to this conundrum, there are some hints in the literature. For example, the membrane bending function described for exomer in collaboration with Arf1 could be part of this conserved function (Paczkowski and Fromme, 2014). Indeed, considering that the ChAPs implicated in this function, Bch1/Bud7, are the least diverged and probably maintained conserved functions, one of the exomer conserved function could be this one. On the other hand, exomer could also act as a platform with any role in post-translational modifications. In this sense, classic exomer cargoes show multiple post-translational modifications, some of them involved in their transport (Arcones et al., 2016; Ritz et al., 2014).

In this new scenario, it is remarkable that most proteins whose final location depends somehow on exomer are related to different kinds of stress. For instance, under heat shock, Chs3 dramatically increases its location at PM in an exomer-dependent way (Valdivia and Schekman, 2003). Also, under cationic stress, Ena1 fires its PM-polarized location in an exomer-dependent manner. Indeed, the hypersensitivity to rapamycin, one of the most conserved phenotypes for exomer mutants (results not shown in this summary), could be consider also as a stressful situation. Rapamycin inhibits TORC1 which in turns downregulates cellular growth and promotes catabolism processes. As it has been accurately described, this process implies a huge shift in protein localization to multiple destinies (Conrad et al., 2014; González and Hall, 2017). Therefore, this conserved phenotype could be signaling a general problem on protein trafficking for exomer mutant in different species.

BIBLIOGRAFÍA/ REFERENCES



BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Alvaro, C.G., and Thorner, J.** (2016). Heterotrimeric G Protein-coupled Receptor Signaling in Yeast Mating Pheromone Response. *J. Biol. Chem.* *291*, 7788–7795.
- Anitei, M., and Hoflack, B.** (2011). Bridging membrane and cytoskeleton dynamics in the secretory and endocytic pathways. *Nat. Cell Biol.* *14*, 11–19.
- Anton, C., Zanolari, B., Arcones, I., Wang, C., Mulet, J.M., Spang, A., and Roncero, C.** (2017). Involvement of the exomer complex in the polarized transport of Ena1 required for *Saccharomyces cerevisiae* survival against toxic cations. *Mol. Biol. Cell* *28*, 3672–3685.
- Anton, C., Valdez Taubas, J., and Roncero, C.** (2018). The Functional Specialization of Exomer as a Cargo Adaptor During the Evolution of Fungi. *Genetics* *208* (4), 1483–1498.
- Arcones, I., Sacristan, C., and Roncero, C.** (2016). Maintaining protein homeostasis: early and late endosomal dual recycling for the maintenance of intracellular pools of the plasma membrane protein Chs3. *Mol. Biol. Cell* *27*, 4021–4032.
- Ariño, J., Ramos, J., and Sychrová, H.** (2010). Alkali metal cation transport and homeostasis in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *74*, 95–120.
- Asensio, C.S., Sirkis, D.W., Maas, J.W., Egami, K., To, T.-L., Brodsky, F.M., Shu, X., Cheng, Y., and Edwards, R.H.** (2013). Self-assembly of VPS41 promotes sorting required for biogenesis of the regulated secretory pathway. *Dev. Cell* *27*, 425–437.
- Babst, M.** (2014). Quality control at the plasma membrane: One mechanism does not fit all. *J. Cell Biol.* *205*, 11–20.
- Bagnat, M., and Simons, K.** (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 14183–14188.
- Bardwell, L.** (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* *26*, 339–350.
- Barfield, R.M., Fromme, J.C., and Schekman, R.** (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol. Biol. Cell* *20*, 4985–4996.
- Barlan, K., and Gelfand, V.I.** (2017). Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *9*, a025817.
- Barlow, L.D., Dacks, J.B., and Wideman, J.G.** (2014). From all to (nearly) none: Tracing adaptin evolution in Fungi. *Cell. Logist.* *4*, e28114.
- Bartlett, K., and Kim, K.** (2014). Insight into Tor2, a budding yeast microdomain protein. *Eur. J. Cell Biol.* *93*, 87–97.
- Bassett, D.E., Boguski, M.S., and Hieter, P.** (1996). Yeast genes and human disease. *Nature* *379*, 589–590.
- Bateman, A., and Chothia, C.** (1996). Fibronectin type III domains in yeast detected by a hidden Markov model. *Curr. Biol.* *6*, 1544–1547.
- Bazinet, C., Katzen, A.L., Morgan, M., Mahowald, A.P., and Lemmon, S.K.** (1993). The *Drosophila* clathrin heavy chain gene: clathrin function is essential in a multicellular organism. *Genetics* *134*, 1119–1134.
- Beck, T., Schmidt, A., and Hall, M.N.** (1999). Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *J. Cell Biol.* *146*, 1227–1238.

- Becuwe, M., Vieira, N., Lara, D., Gomes-Rezende, J., Soares-Cunha, C., Casal, M., Haguenaer-Tsapis, R., Vincent, O., Paiva, S., and Léon, S.** (2012). A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J. Cell Biol.* *196*, 247–259.
- De Boer, M., Bebelman, J.P., Gonçalves, P.M., Maat, J., Van Heerikhuizen, H., and Planta, R.J.** (1998). Regulation of expression of the amino acid transporter gene BAP3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* *30*, 603–613.
- Bi, E., and Park, H.-O.** (2012). Cell Polarization and Cytokinesis in Budding Yeast. *Genetics* *191*, 347–387.
- Bilodeau, P.S., Winistorfer, S.C., Allaman, M.M., Surendhran, K., Kearney, W.R., Robertson, A.D., and Piper, R.C.** (2004). The GAT domains of clathrin-associated GGA proteins have two ubiquitin binding motifs. *J. Biol. Chem.* *279*, 54808–54816.
- Biswas, S., Van Dijck, P., and Datta, A.** (2007). Environmental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *71*, 348–376.
- Black, M.W., and Pelham, H.R.** (2000). A selective transport route from Golgi to late endosomes that requires the yeast GGA proteins. *J. Cell Biol.* *151*, 587–600.
- Blatch, G.L., and Lässle, M.** (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *BioEssays* *21*, 932–939.
- Boeckstaens, M., Llinares, E., Van Vooren, P., and Marini, A.M.** (2014). The TORC1 effector kinase Npr1 fine tunes the inherent activity of the Mep2 ammonium transport protein. *Nat. Commun.* *5*, 3101.
- Boehm, M., and Bonifacino, J.S.** (2001). Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2907–2920.
- Boettner, D.R., Chi, R.J., and Lemmon, S.K.** (2012). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Cell Biol.* *14*, 2–10.
- Bonifacino, J.S.** (2004). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 23–32.
- Bonifacino, J.S.** (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J. Cell Biol.* *204*, 7–17.
- Bonifacino, J.S., and Glick, B.S.** (2004). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* *116*, 153–166.
- Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H.** (2008). Retromer. *Curr. Opin. Cell Biol.* *20*, 427–436.
- Bonifacino, J.S., and Rojas, R.** (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 568–579.
- Bowers, K., and Stevens, T.H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* *1744*, 438–454.
- Bulawa, C.E.** (1993). Genetics and Molecular Biology of Chitin Synthesis in Fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* *47*, 505–534.
- Bulawa, C.E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W.L., and Robbins, P.W.** (1986). The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* *46*, 213–225.
- Burd, C., and Cullen, P.J.** (2014). Retromer: A Master Conductor of Endosome Sorting. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *6*, a016774–a016774.
- Cabib, E., and Arroyo, J.** (2013). How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat. Rev. Microbiol.* *11*, 648–655.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Canagarajah, B.J., Ren, X., Bonifacino, J.S., and Hurley, J.H.** (2013). The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Sci.* *22*, 517–529.
- Chen, S.H., Chen, S., Tokarev, A.A., Liu, F., Jedd, G., and Segev, N.** (2005). Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Mol. Biol. Cell* *16*, 178–192.
- Chidambaram, S., Müllers, N., Wiederhold, K., Haucke, V., and 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. *J. Biol. Chem.* *279*, 4175–4179.
- Chidambaram, S., Zimmermann, J., and von Mollard, G.F.** (2008). ENTH domain proteins are cargo adaptors for multiple SNARE proteins at the TGN endosome. *J. Cell Sci.* *121*, 329–338.
- Choi, J., and Kim, S.-H.** (2017). A genome Tree of Life for the Fungi kingdom. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, 9391–9396.
- Chuang, J.S., and Schekman, R.W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J. Cell Biol.* *135*, 597–610.
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., and Thevelein, J.M.** (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *38*, 254–299.
- De Craene, J.-O., Ripp, R., Lecompte, O., Thompson, J.D., Poch, O., and Friant, S.** (2012). Evolutionary analysis of the ENTH/ANTH/VHS protein superfamily reveals a coevolution between membrane trafficking and metabolism. *BMC Genomics* *13*, 297.
- De Craene, J.-O., Bertazzi, D., Bär, S., and Friant, S.** (2017). Phosphoinositides, Major Actors in Membrane Trafficking and Lipid Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 634.
- Cyert, M.S., and Philpott, C.C.** (2013). Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *193*, 677–713.
- Daboussi, L., Costaguta, G., and Payne, G.S.** (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* *14*, 239–248.
- Dacks, J.B., and Field, M.C.** (2007). Evolution of the eukaryotic membrane-trafficking system: origin, tempo and mode. *J. Cell Sci.* *120*, 2977–2985.
- Dahl, S.G., Sylte, I., and Ravna, A.W.** (2004). Structures and models of transporter proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *309*, 853–860.
- Day, K.J., Casler, J.C., and Glick, B.S.** (2018). Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System. *Dev. Cell* *44*, 56–72.e4.
- De, M., Abazeed, M.E., and 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. *Mol. Biol. Cell* *24*, 495–509.
- Dell'Angelica, E.C., Klumperman, J., Stoorvogel, W., and Bonifacino, J.S.** (1998). Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin. *Science* *280*, 431–434.
- Deng, Y., Guo, Y., Watson, H., Au, W.-C., Shakoury-Elizeh, M., Basrai, M.A., Bonifacino, J.S., and 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. *J. Biol. Chem.* *284*, 23830–23841.
- Denks, K., Vogt, A., Sachelaru, I., Petriman, N.-A., Kudva, R., and Koch, H.-G.** (2014). The Sec translocon mediated protein transport in prokaryotes and eukaryotes. *Mol. Membr. Biol.* *31*, 58–84.

- Derby, M.C., and Gleeson, P.A.** (2007). New Insights into Membrane Trafficking and Protein Sorting. In *International Review of Cytology*, pp. 47–116.
- Diepeveen, E.T., de la Cruz, L.I., and Laan, L.** (2017). Evolutionary dynamics in the fungal polarization network, a mechanistic perspective. *Biophys. Rev.* *9*, 375–387.
- Dujon, B.A., and Louis, E.J.** (2017). Genome Diversity and Evolution in the Budding Yeasts (*Saccharomycotina*). *Genetics* *206*, 717–750.
- Duncan, M.C., and Payne, G.S.** (2003). ENTH/ANTH domains expand to the Golgi. *Trends Cell Biol.* *13*, 211–215.
- Duncan, M.C., Costaguta, G., and Payne, G.S.** (2003). Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nat. Cell Biol.* *5*, 77–81.
- Dudley, A.M., Janse, D.M., Tanay, A., Shamir, R., and Church, G.M.** (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.* *1*, E1–E11.
- Edamatsu, M., and Toyoshima, Y.Y.** (2003). Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 641–645.
- Erpapazoglou, Z., Froissard, M., Nondier, I., Lesuisse, E., Haguenaer-Tsapis, R., and Belgareh-Touzé, N.** (2008). Substrate- and Ubiquitin-Dependent Trafficking of the Yeast Siderophore Transporter Sit1. *Traffic* *9*, 1372–1391.
- Falco, S.C., and Dumas, K.S.** (1985). Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl. *Genetics* *109*, 21–35.
- Felice, M.R., De Domenico, I., Li, L., Ward, D.M., Bartok, B., Musci, G., and Kaplan, J.** (2005). Post-transcriptional regulation of the yeast high affinity iron transport system. *J. Biol. Chem.* *280*, 22181–22190.
- Fell, G.L., Munson, A.M., Croston, M.A., and Rosenwald, A.G.** (2011). Identification of yeast genes involved in k homeostasis: loss of membrane traffic genes affects k uptake. *G3 (Bethesda)*. *1*, 43–56.
- Ferreira, A.P.A., and Boucrot, E.** (2017). Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis. *Trends Cell Biol.*
- Feyder, S., De Craene, J.-O., Bär, S., Bertazzi, D.L., and Friant, S.** (2015). Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 1509–1525.
- Foderaro, J., Douglas, L., and Konopka, J.** (2017). MCC/Eisosomes Regulate Cell Wall Synthesis and Stress Responses in Fungi. *J. Fungi* *3*, 61.
- Foote, C., and 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. *J. Cell Biol.* *173*, 615–626.
- Fotin, A., Cheng, Y., Grigorieff, N., Walz, T., Harrison, S.C., and Kirchhausen, T.** (2004). Structure of an auxilin-bound clathrin coat and its implications for the mechanism of uncoating. *Nature* *432*, 649–653.
- Free, S.J.** (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv. Genet.* *81*, 33–82.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H.** (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *15*, 1541–1553.
- González, A., and Hall, M.N.** (2017). Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* *36*, 397–408.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- González, A., Shimobayashi, M., Eisenberg, T., Merle, D.A., Pendl, T., Hall, M.N., and Moustafa, T.** (2015). TORC1 Promotes Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 via the AGC Kinase Ypk3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* *10*, e0120250.
- Goode, B.L., Eskin, J.A., and Wendland, B.** (2015). Actin and Endocytosis in Budding Yeast. *Genetics* *199*, 315–358.
- Gournas, C., Prévost, M., Krammer, E.-M., and André, B.** (2016). Function and Regulation of Fungal Amino Acid Transporters: Insights from Predicted Structure. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 69–106.
- Guo, Y., Yang, F., and Tang, X.** (2017). An Overview of Protein Secretion in Yeast and Animal Cells. In *Methods in Molecular Biology*, (Humana Press Inc.), pp. 1–17.
- Ha, S.-A., Torabinejad, J., DeWald, D.B., Wenk, M.R., Lucast, L., De Camilli, P., Newitt, R.A., Aebersold, R., and 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. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1319–1333.
- Hammer, J.A., and Sellers, J.R.** (2011). Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 13–26.
- Harnett, M.M., Pineda, M.A., Latré de Laté, P., Eason, R.J., Besteiro, S., Harnett, W., and Langsley, G.** (2017). From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomed. J.* *40*, 9–22.
- Harsay, E., and Bretscher, A.** (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* *131*, 297–310.
- Harsay, E., and Schekman, R.** (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J. Cell Biol.* *156*, 271–285.
- Hess, D.C., Lu, W., Rabinowitz, J.D., and Botstein, D.** (2006). Ammonium Toxicity and Potassium Limitation in Yeast. *PLoS Biol.* *4*, e351.
- Hierro, A., Gershlick, D.C., Rojas, A.L., and Bonifacio, J.S.** (2015). Formation of Tubulovesicular Carriers from Endosomes and Their Fusion to the trans-Golgi Network. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* *318*, 159–202.
- Hirst, J., D. Barlow, L., Francisco, G.C., Sahlender, D.A., Seaman, M.N.J., Dacks, J.B., and Robinson, M.S.** (2011). The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLoS Biol.* *9*, e1001170.
- Hirst, J., Itzhak, D.N., Antrobus, R., Borner, G.H.H., and Robinson, M.S.** (2018). Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLOS Biol.* *16*, e2004411.
- Howell, G.J., Holloway, Z.G., Cobbold, C., Monaco, A.P., and Ponnambalam, S.** (2006). Cell biology of membrane trafficking in human disease. *Int. Rev. Cytol.* *252*, 1–69.
- Hoya, M., Yanguas, F., Moro, S., Prescianotto-Baschong, C., Doncel, C., de León, N., Curto, M.-Á., Spang, A., and Valdivieso, M.-H.** (2017). Traffic through the trans-Golgi network and the endosomal system requires collaboration between exomer and clathrin adaptors in fission yeast. *Genetics* *205*, 673–690.
- Huizing, M., Anikster, Y., and Gahl, W.A.** (2000). Hermansky-Pudlak syndrome and related disorders of organelle formation. *Traffic* *1*, 823–835.
- Hung, C.-W., and Duncan, M.C.** (2016). Clathrin binding by the adaptor Ent5 promotes late stages of clathrin coat maturation. *Mol. Biol. Cell* *27*, 1143–1153.

- Huranova, M., Muruganandam, G., Weiss, M., and Spang, A.** (2016). Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep.* *17*, 202–219.
- Huyton, T., Bates, P.A., Zhang, X., Sternberg, M.J., and Freemont, P.S.** (2000). The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. *Mutat. Res.* *460*, 319–332.
- Isnard, A.-D., Thomas, D., and Surdin-Kerjan, Y.** (1996). The Study of Methionine Uptake in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals a New Family of Amino Acid Permeases. *J. Mol. Biol.* *262*, 473–484.
- Janvier, K., Kato, Y., Boehm, M., Rose, J.R., Martina, J.A., Kim, B.-Y., Venkatesan, S., and Bonifacino, J.S.** (2003). Recognition of dileucine-based sorting signals from HIV-1 Nef and LIMP-II by the AP-1 gamma-sigma1 and AP-3 delta-sigma3 hemicomplexes. *J. Cell Biol.* *163*, 1281–1290.
- Jin, Y., Sultana, A., Gandhi, P., Franklin, E., Hamamoto, S., Khan, A.R., Munson, M., Schekman, R., and Weisman, L.S.** (2011). Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev. Cell* *21*, 1156–1170.
- Kanaseki, T., and Kadota, K.** (1969). The “vesicle in a basket”. A morphological study of the coated vesicle isolated from the nerve endings of the guinea pig brain, with special reference to the mechanism of membrane movements. *J. Cell Biol.* *42*, 202–220.
- Kanazawa, S., Driscoll, M., and Struhl, K.** (1988). ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 664–673.
- Keen, J.H.** (1987). Clathrin assembly proteins: affinity purification and a model for coat assembly. *J. Cell Biol.* *105*, 1989–1998.
- Keener, J.M., and Babst, M.** (2013). Quality control and substrate-dependent downregulation of the nutrient transporter Fur4. *Traffic* *14*, 412–427.
- Kim, K., and Gadila, S.K.G.** (2016). Cargo trafficking from the trans-Golgi network towards the endosome. *Biol. Cell* *108*, 205–218.
- Kins, S., Lauther, N., Szodorai, A., and Beyreuther, K.** (2006). Subcellular trafficking of the amyloid precursor protein gene family and its pathogenic role in Alzheimer’s disease. *Neurodegener. Dis.* *3*, 218–226.
- Kitakura, S., Vanneste, S., Robert, S., Löfke, C., Teichmann, T., Tanaka, H., and Friml, J.** (2011). Clathrin mediates endocytosis and polar distribution of PIN auxin transporters in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *23*, 1920–1931.
- Kota, J., and Ljungdahl, P.O.** (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell Biol.* *168*, 79–88.
- Kralt, A., Carretta, M., Mari, M., Reggiori, F., Steen, A., Poolman, B., and Veenhoff, L.M.** (2015). Intrinsically disordered linker and plasma membrane-binding motif sort Ist2 and Ssy1 to junctions. *Traffic* *16*, 135–147.
- Kruckeberg, A.L., Ye, L., Berden, J.A., and van Dam, K.** (1999). Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem. J.* *339* (Pt 2), 299–307.
- Kurokawa, K., Okamoto, M., and Nakano, A.** (2014). Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat. Commun.* *5*, 3653.
- Lamb, T.M., and Mitchell, A.P.** (2003). The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 677–686.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Larimer, F.W., Ramey, D.W., Lijinsky, W., and Epler, J.L.** (1978). Mutagenicity of methylated N-nitrosopiperidines in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* *57*, 155–161.
- Lee, G.-J., Kim, H., Kang, H., Jang, M., Lee, D.W., Lee, S., and Hwang, I.** (2007). EpsinR2 interacts with clathrin, adaptor protein-3, AtVTI12, and phosphatidylinositol-3-phosphate. Implications for EpsinR2 function in protein trafficking in plant cells. *Plant Physiol.* *143*, 1561–1575.
- de León, N., Hoya, M., Curto, M.-A., Moro, S., Yanguas, F., Doncel, C., and Valdivieso, M.-H.** (2016). The AP-2 complex is required for proper temporal and spatial dynamics of endocytic patches in fission yeast. *Mol. Microbiol.* *100*, 409–424.
- Levin, D.E.** (2011). Regulation of Cell Wall Biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The Cell Wall Integrity Signaling Pathway. *Genetics* *189*, 1145–1175.
- Lingwood, D., and Simons, K.** (2010). Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science.* *327*, 46–50.
- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S.F., and Graham, T.R.** (2008). P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol. Biol. Cell* *19*, 3526–3535.
- Ljungdahl, P.O., and Daignan-Fornier, B.** (2012). Regulation of Amino Acid, Nucleotide, and Phosphate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *190*, 885–929.
- Ljungdahl, P.O., Gimeno, C.J., Styles, C.A., and Fink, G.R.** (1992). SHR3: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell* *71*, 463–478.
- Longtine, M.S., Mckenzie III, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R.** (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *14*, 953–961.
- MacDonald, C., and Piper, R.C.** (2016). Cell surface recycling in yeast: mechanisms and machineries. *Biochem. Soc. Trans.* *44*, 474–478.
- MacGurn, J.A., Hsu, P.-C., and Emr, S.D.** (2012). Ubiquitin and Membrane Protein Turnover: From Cradle to Grave. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 231–259.
- Madrid, R., Gómez, M.J., Ramos, J., and Rodríguez-Navarro, A.** (1998). Ectopic potassium uptake in *trk1 trk2* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* correlates with a highly hyperpolarized membrane potential. *J. Biol. Chem.* *273*, 14838–14844.
- Maeda, T.** (2012). The signaling mechanism of ambient pH sensing and adaptation in yeast and fungi. *FEBS J.* *279*, 1407–1413.
- Martín-García, R., de León, N., Sharifmoghadam, M.R., Curto, M.-Á., Hoya, M., Bustos-Sanmamed, P., and 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. *Cell. Mol. Life Sci.* *68*, 2907–2917.
- De Matteis, M.A., and Luini, A.** (2008). Exiting the Golgi complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 273–284.
- Mazel, T.** (2017). Crosstalk of cell polarity signaling pathways. *Protoplasma* *254*, 1241–1258.
- McCarty, T.P., and Pappas, P.G.** (2016). Invasive Candidiasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* *30*, 103–124.
- Menant, A., Barbey, R., and Thomas, D.** (2006). Substrate-mediated remodeling of methionine transport by multiple ubiquitin-dependent mechanisms in yeast cells. *EMBO J.* *25*, 4436–4447.

- Merhi, A., and Andre, B.** (2012). Internal Amino Acids Promote Gap1 Permease Ubiquitylation via TORC1/Npr1/14-3-3-Dependent Control of the Bul Arrestin-Like Adaptors. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 4510–4522.
- Miller, K.E., Kim, Y., Huh, W.-K., and Park, H.-O.** (2015). Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis: Advances and Recent Applications for Genome-Wide Interaction Studies. *J. Mol. Biol.* *427*, 2039–2055.
- Miller, S.E., Collins, B.M., McCoy, A.J., Robinson, M.S., and Owen, D.J.** (2007). A SNARE-adaptor interaction is a new mode of cargo recognition in clathrin-coated vesicles. *Nature* *450*, 570–574.
- Miller, S.E., Mathiasen, S., Bright, N.A., Pierre, F., Kelly, B.T., Kladt, N., Schauss, A., Merrifield, C.J., Stamou, D., Höning, S., et al.** (2015). CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Dev. Cell* *33*, 163–175.
- Morvan, J., de Craene, J.-O., Rinaldi, B., Addis, V., Misslin, C., and Friant, S.** (2015). Btn3 regulates the endosomal sorting function of the yeast Ent3 epsin, an adaptor for SNARE proteins. *J. Cell Sci.* *128*, 706–716.
- Mulet, J.M., Leube, M.P., Kron, S.J., Rios, G., Fink, G.R., and 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. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3328–3337.
- Murguía, J.R., Bellés, J.M., and Serrano, R.** (1996). The yeast HAL2 nucleotidase is an in vivo target of salt toxicity. *J. Biol. Chem.* *271*, 29029–29033.
- de Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gomez, N., and Ariño, J.** (1998). The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 7357–7362.
- Nakatsu, F., Hase, K., and Ohno, H.** (2014). The role of the clathrin adaptor AP-1: Polarized sorting and beyond. *Membranes (Basel)*. *4*, 747–763.
- Noordstra, I., and Akhmanova, A.** (2017). Linking cortical microtubule attachment and exocytosis. *F1000Research* *6*, 469.
- O'Donnell, A.F., Apffel, A., Gardner, R.G., and Cyert, M.S.** (2010). Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol. Biol. Cell* *21*, 3552–3566.
- Obara, K., and Kihara, A.** (2014). Signaling Events of the Rim101 Pathway Occur at the Plasma Membrane in a Ubiquitination-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* *34*, 3525–3534.
- Obara, K., Yamamoto, H., and Kihara, A.** (2012). Membrane Protein Rim21 Plays a Central Role in Sensing Ambient pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *287*, 38473–38481.
- Ohno, H., Stewart, J., Fournier, M.C., Bosshart, H., Rhee, I., Miyatake, S., Saito, T., Gallusser, A., Kirchhausen, T., and Bonifacino, J.S.** (1995). Interaction of tyrosine-based sorting signals with clathrin-associated proteins. *Science* *269*, 1872–1875.
- Paczkowski, J.E., and Fromme, J.C.** (2014). Structural basis for membrane binding and remodeling by the exomer secretory vesicle cargo adaptor. *Dev. Cell* *30*, 610–624.
- Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., Strassner, A.M., and Fromme, J.C.** (2012). The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* *31*, 4191–4203.
- Paczkowski, J.E., Richardson, B.C., and Fromme, J.C.** (2015). Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol.* *25*, 408–416.
- Palade, G.** (1975). Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science*. *189*, 867–867.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Papanikou, E., and Glick, B.S.** (2014). Golgi compartmentation and identity. *Curr. Opin. Cell Biol.* *29*, 74–81.
- Payne, G.S., and Schekman, R.** (1985). A test of clathrin function in protein secretion and cell growth. *Science* *230*, 1009–1014.
- Pearse, B.M.** (1975). Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J. Mol. Biol.* *97*, 93–98.
- Peñalva, M.A., Lucena-Agell, D., and Arst, H.N.** (2014). Liaison alcaline: Pals entice non-endosomal ESCRTs to the plasma membrane for pH signaling. *Curr. Opin. Microbiol.* *22*, 49–59.
- Pérez-Martín, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J., and Carbó, N.** (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol. Genet. Genomics* *276*, 211–229.
- Picco, A., Irastorza-Azcarate, I., Specht, T., Böke, D., Pazos, I., Rivier-Cordey, A.-S., Devos, D.P., Kaksonen, M., and Gallego, O.** (2017). The In Vivo Architecture of the Exocyst Provides Structural Basis for Exocytosis. *Cell* *168*, 400–412.e18.
- Ramírez-Macias, I., Barlow, L.D., Anton, C., Spang, A., Roncero, C., and Dacks, J.B.** (in review) Evolutionary cell biology traces the rise of exomer complex function in Fungi from an ancient eukaryotic component.
- Ren, J., Wen, L., Gao, X., Jin, C., Xue, Y., and Yao, X.** (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng. Des. Sel.* *21*, 639–644.
- Richardson, B.C., and Fromme, J.C.** (2013). The exomer cargo adaptor features a flexible hinge domain. *Structure* *21*, 486–492.
- Rios, G., Ferrando, A., and Serrano, R.** (1997). Mechanisms of salt tolerance conferred by overexpression of the HAL1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 515–528.
- Ríos, G., Cabedo, M., Rull, B., Yenush, L., Serrano, R., and Mulet, J.M.** (2013). Role of the yeast multidrug transporter Qdr2 in cation homeostasis and the oxidative stress response. *FEMS Yeast Res.* *13*, 97–106.
- Risselada, H.J., and Grubmüller, H.** (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: Recent insights from molecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *22*, 187–196.
- Ritz, A.M., Trautwein, M., Grassinger, F., and Spang, A.** (2014). The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif. *Cell Rep.* *7*, 249–260.
- Robinson, M.S.** (1987). 100-kD coated vesicle proteins: molecular heterogeneity and intracellular distribution studied with monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* *104*, 887–895.
- Robinson, M.S.** (2015). Forty Years of Clathrin-coated Vesicles. *Traffic* *16*, 1210–1238.
- Rockenbauch, U., Ritz, A.M., Sacristan, C., Roncero, C., and Spang, A.** (2012). The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Mol. Biol. Cell* *23*, 4402–4415.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J.** (2013). Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* *30*, 165–177.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* *41*, 367–378.
- Roncero, C., Valdivieso, M.H., Ribas, J.C., and Durán, A.** (1988). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J. Bacteriol.* *170*, 1950–1954.
- Roncero, C., Sanchez-Diaz, A., and Valdivieso, M.H.** (2016). Chitin synthesis and fungal morphogenesis. *Mycota III. Biochem. Mol. Biol.* 167–190.

- Rothman, J.E., and Wieland, F.T.** (1996). Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272, 227–234.
- Rout, M.P., and Field, M.C.** (2017). The Evolution of Organellar Coat Complexes and Organization of the Eukaryotic Cell. *Annu. Rev. Biochem.* 86, 637–657.
- Row, P.E., Prior, I.A., McCullough, J., Clague, M.J., and Urbé, S.** (2006). The ubiquitin isopeptidase UBPY regulates endosomal ubiquitin dynamics and is essential for receptor down-regulation. *J. Biol. Chem.* 281, 12618–12624.
- Sacristan, C., Reyes, A., and Roncero, C.** (2012). Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol. Microbiol.* 83, 1124–1135.
- Sacristan, C., Manzano-Lopez, J., Reyes, A., Spang, A., Muñiz, M., and Roncero, C.** (2013). Oligomerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol. Microbiol.* 90, 252–266.
- Sanchatjate, S., and 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. *Mol. Biol. Cell* 17, 4157–4166.
- Sandmann, T., Herrmann, J.M., Dengjel, J., Schwarz, H., and Spang, A.** (2003). Suppression of coatomer mutants by a new protein family with COPI and COPII binding motifs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 3097–3113.
- Santiago-Tirado, F.H., and Bretscher, A.** (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 21, 515–525.
- Santos, A.L., and Preta, G.** (2018). Lipids in the cell: organisation regulates function. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 1909–1927.
- Santos, B., and Snyder, M.** (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell Biol.* 136, 95–110.
- Santos, B., and Snyder, M.** (2003). Specific Protein Targeting during Cell Differentiation: Polarized Localization of Fus1p during Mating Depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 2, 821–825.
- Santos, B., Duran, A., and Valdivieso, M.H.** (1997). CHS5, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2485–2496.
- Sato, M., Dhut, S., and Toda, T.** (2005). New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 583–591.
- Schekman, R., and Orci, L.** (1996). Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271, 1526–1533.
- Schlacht, A., Herman, E.K., Klute, M.J., Field, M.C., and Dacks, J.B.** (2014). Missing Pieces of an Ancient Puzzle: Evolution of the Eukaryotic Membrane-Trafficking System. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a016048.
- Schöneberg, J., Lee, I.-H., Iwasa, J.H., and Hurley, J.H.** (2017). Reverse-topology membrane scission by the ESCRT proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 5–17.
- Schonthaler, H.B., Fleisch, V.C., Biehlmaier, O., Makhankov, Y., Rinner, O., Bahadori, R., Geisler, R., Schwarz, H., Neuhaus, S.C.F., and Dahm, R.** (2008). The zebrafish mutant *lbk/vam6* resembles human multisystemic disorders caused by aberrant trafficking of endosomal vesicles. *Development* 135, 387–399.

BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

- Schroeter, S., Beckmann, S., and Schmitt, H.D.** (2016). Coat/Tether Interactions-Exception or Rule? *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 44.
- 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., and Piper, R.C.** (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* 6, 252–259.
- Serra-Cardona, A., Canadell, D., and Arino, J.** (2015). Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. *Microb. Cell* 2, 182–196.
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., and Eggeling, C.** (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374.
- Shao, S., and Hegde, R.S.** (2011). Membrane Protein Insertion at the Endoplasmic Reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 25–56.
- Shi, Y., Stefan, C.J., Rue, S.M., Teis, D., and Emr, S.D.** (2011). Two novel WD40 domain-containing proteins, Ere1 and Ere2, function in the retromer-mediated endosomal recycling pathway. *Mol. Biol. Cell* 22, 4093–4107.
- Simpson, F., Bright, N.A., West, M.A., Newman, L.S., Darnell, R.B., and Robinson, M.S.** (1996). A novel adaptor-related protein complex. *J. Cell Biol.* 133, 749–760.
- Smits, G.J., van den Ende, H., and Klis, F.M.** (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781–794.
- Spang, A.** (2008). The life cycle of a transport vesicle. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 2781–2789.
- Spang, A.** (2015). The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane. *Membranes (Basel)*. 5, 84–98.
- Spira, F., Mueller, N.S., Beck, G., von Olshausen, P., Beig, J., and Wedlich-Söldner, R.** (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* 14, 640–648.
- Springer, S., Spang, A., and Schekman, R.** (1999). A primer on vesicle budding. *Cell* 97, 145–148.
- Starr, T.L., Pagant, S., Wang, C.-W., and 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, e46386.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villén, J.** (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat. Methods* 10, 676–682.
- Tonikian, R., Xin, X., Toret, C.P., Gfeller, D., Landgraf, C., Panni, S., Paoluzi, S., Castagnoli, L., Currell, B., Seshagiri, S., et al.** (2009). Bayesian Modeling of the Yeast SH3 Domain Interactome Predicts Spatiotemporal Dynamics of Endocytosis Proteins. *PLoS Biol.* 7, e1000218.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., and Spang, A.** (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* 25, 943–954.
- Trilla, J.A., Durán, A., and Roncero, C.** (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145, 1153–1163.
- Trueheart, J., Boeke, J.D., and Fink, G.R.** (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2316–2328.

- Ungewickell, E., and Branton, D.** (1981). Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289, 420–422.
- Ungewickell, E., Ungewickell, H., Holstein, S.E.H., Lindner, R., Prasad, K., Barouch, W., Martini, B., Greene, L.E., and Eisenberg, E.** (1995). Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378, 632–635.
- Valdez-Taubas, J., and Pelham, H.** (2005). Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 24, 2524–2532.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R.** (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 10287–10292.
- Valdivia, R.H., Baggott, D., Chuang, J.S., and 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. *Dev. Cell* 2, 283–294.
- Valdivieso, M.H., Mol, P.C., Shaw, J.A., Cabib, E., and Durán, A.** (1991). CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 114, 101–109.
- Viotti, C., Bubeck, J., Stierhof, Y.-D., Krebs, M., Langhans, M., van den Berg, W., van Dongen, W., Richter, S., Geldner, N., Takano, J., et al.** (2010). Endocytic and secretory traffic in Arabidopsis merge in the trans-Golgi network/early endosome, an independent and highly dynamic organelle. *Plant Cell* 22, 1344–1357.
- Wada, M., Okabe, K., Kataoka, M., Shimizu, S., Yokota, A., and Takagi, H.** (2008). Distribution of L-Azetidine-2-carboxylate N-Acetyltransferase in Yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 582–586.
- Wakana, Y., van Galen, J., Meissner, F., Scarpa, M., Polishchuk, R.S., Mann, M., and Malhotra, V.** (2012). A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.* 31, 3976–3990.
- Wang, C.W., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R.** (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* 174, 973–983.
- Weiskoff, A.M., and Fromme, J.C.** (2014). Distinct N-terminal regions of the exomer secretory vesicle cargo Chs3 regulate its trafficking itinerary. *Front. Cell Dev. Biol.* 2, 47.
- Yenush, L., Mulet, J.M., Ariño, J., and Serrano, R.** (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* 21, 920–929.
- Yenush, L., Merchan, S., Holmes, J., and Serrano, R.** (2005). pH-Responsive, posttranslational regulation of the Trk1 potassium transporter by the type 1-related Ppz1 phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8683–8692.
- Yeung, B.G., and Payne, G.S.** (2001). Clathrin interactions with C-terminal regions of the yeast AP-1 beta and gamma subunits are important for AP-1 association with clathrin coats. *Traffic* 2, 565–576.
- Zanolari, B., Rockenbauch, U., Trautwein, M., Clay, L., Barral, Y., and Spang, A.** (2011). Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* 124, 1055–1066.
- Zaremba, S., and Keen, J.H.** (1983). Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J. Cell Biol.* 97, 1339–1347.
- Zhang, W., Du, G., Zhou, J., and Chen, J.** (2018). Regulation of Sensing, Transportation, and Catabolism of Nitrogen Sources in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 82, e00040-17.

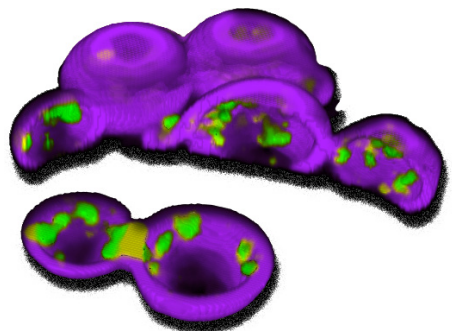
BIBLIOGRAFÍA/REFERENCES

Ziman, M., Chuang, J.S., Tsung, M., Hamamoto, S., and Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1565–1576.

Zimmermann, J., Chidambaram, S., and 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. *Biochem. J.* 431, 123–134.

Ziółkowska, N.E., Christiano, R., and Walther, T.C. (2012). Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* 22, 151–158.

MATERIAL
SUPPLEMENTARIO/
SUPPLEMENTAL
MATERIAL



Supplemental Materials

Molecular Biology of the Cell

Anton et al., 2017

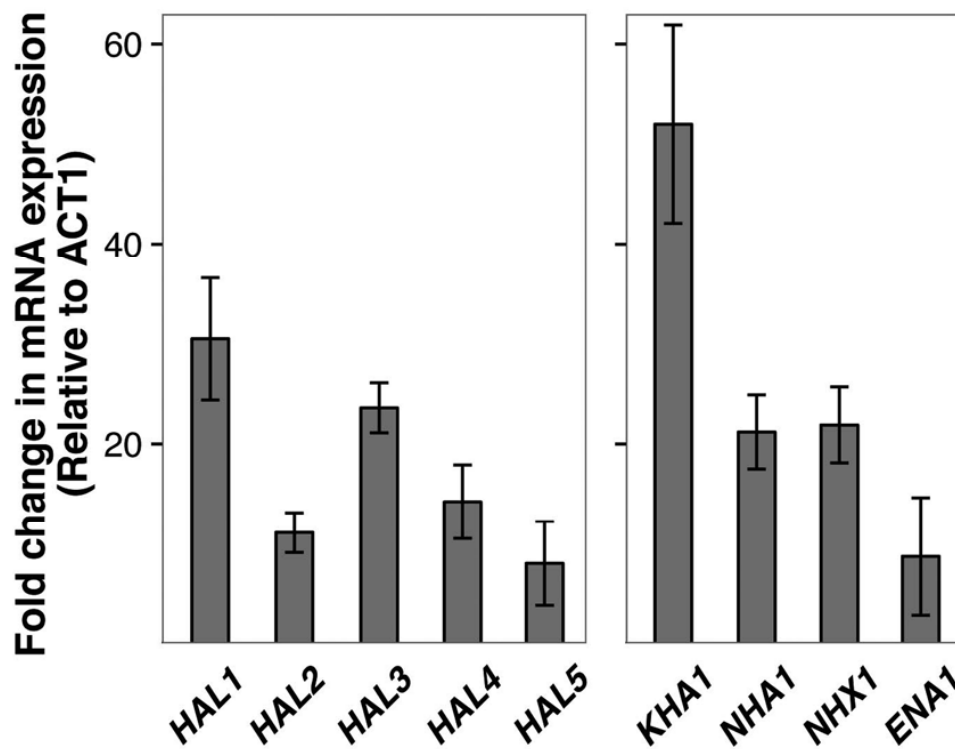


Fig S1: Quantification of the overexpression levels. mRNA levels derived for each plasmid were determined in cells growing in SD media using qPCR with dedicated primers for each gene. Values are represented relative to those of the *ACT1* gene measured in the same sample. The values are the average of 4 independent analyses.

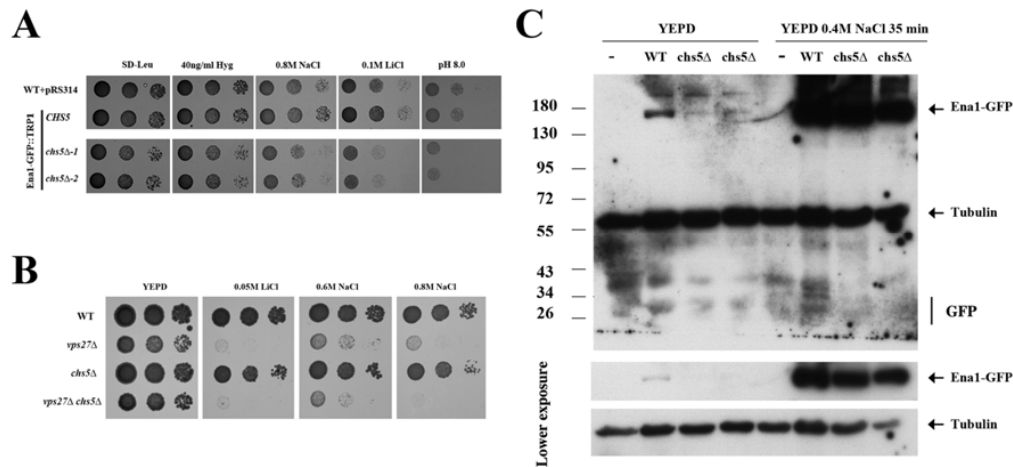


Fig S2: Characterization of Ena1-GFP strains. (A) Sensitivity of the strains containing the *ENA1-GFP::TRP1* construct. Note the normal sensitivity of this strain compared to a wild type and the increased sensitivity to different compounds of the *chs5Δ* mutant in the same genetic background. (B) Sensitivity of the indicated strains to lithium and sodium. Notice the increased sensitivity shown by the double *chs5Δ vps27Δ* mutant. (C) Western blot showing Ena1-GFP levels in wild type and *chs5Δ* strain under different growth conditions. Lower images are from the same experiment but with lower exposure time. Note the reduced levels of Ena1-GFP in the *chs5Δ* strains, but also the almost complete absence of degradation in both strains, consistent with the faint vacuolar staining observed (See Figure 5). NaCl treatment clearly increases Ena1 levels in both strains. Note that the experiment was performed in YEPD media in order to detect basal expression levels of Ena1-GFP, undetectable after growth in SD media (see Figure 5B).

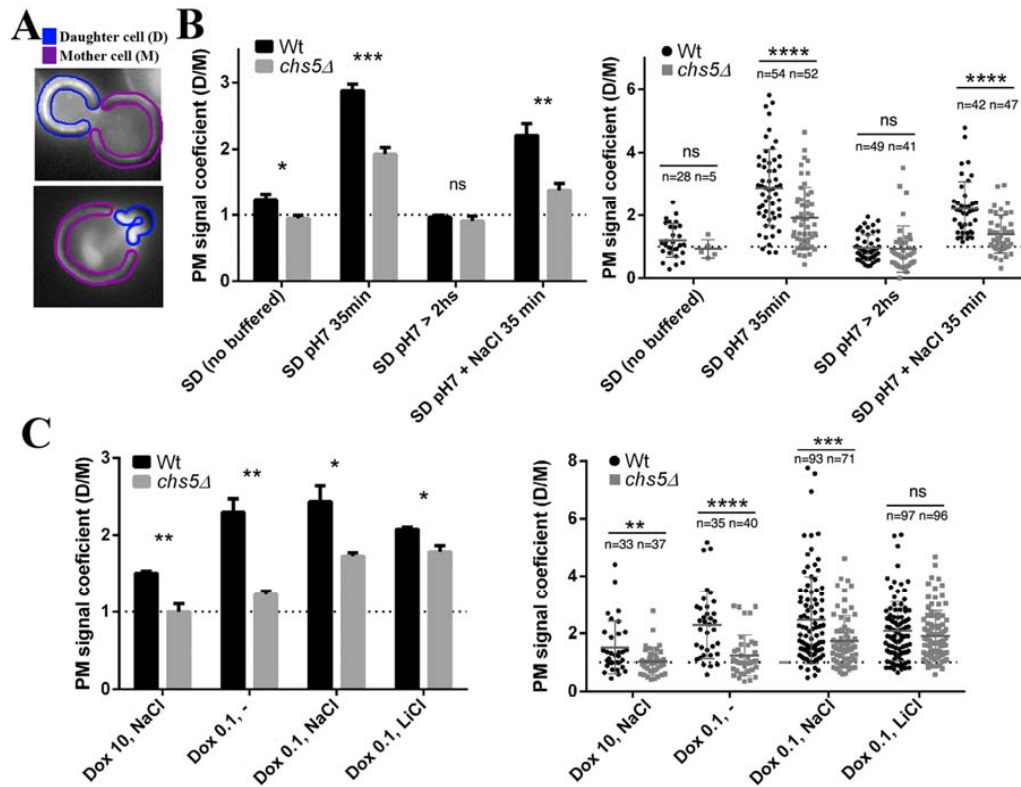


Fig S3:Quantification ofEna1-GFP polarization. (A) Scheme representing the measured area to obtain the Daughter/Mother Polarization Coefficient of Ena1-GFP. (B) Localization of a chromosomally-tagged version of Ena1-GFP in wild type and *chs5Δ*. Cells were grown on selective SD media to logarithmic phase and then incubated under the indicated conditions as described for experiments shown in Figure 5A. Left panel represents of the Ena1-GFP polarization coefficient using the average of the coefficients obtained for any experiment (n=4 experiments). Right panel shows the coefficients for any measured cell (n=number of cells). (C) Ena1-GFP expressed from the tetO promoter was visualized by fluorescence microscopy after growth on the indicated dox concentration for 2 hrs. Cation treatment was performed for additional 30 min. Experimental conditions are identical to those described for Figure 5D. As in (B), left panel represents the average of the coefficient from 3 independent experiments, and right the coefficient for single cells (n=number of cells). The values represented correspond to the mean (top of the bar or central line) and the standard error of the mean (whiskers). The horizontal dashed line indicates the situation of no polarization (daughter and mother

intensities are equal). For each condition, the total number of cells measured (n) is indicated. See materials and methods for details on fluorescence quantification.

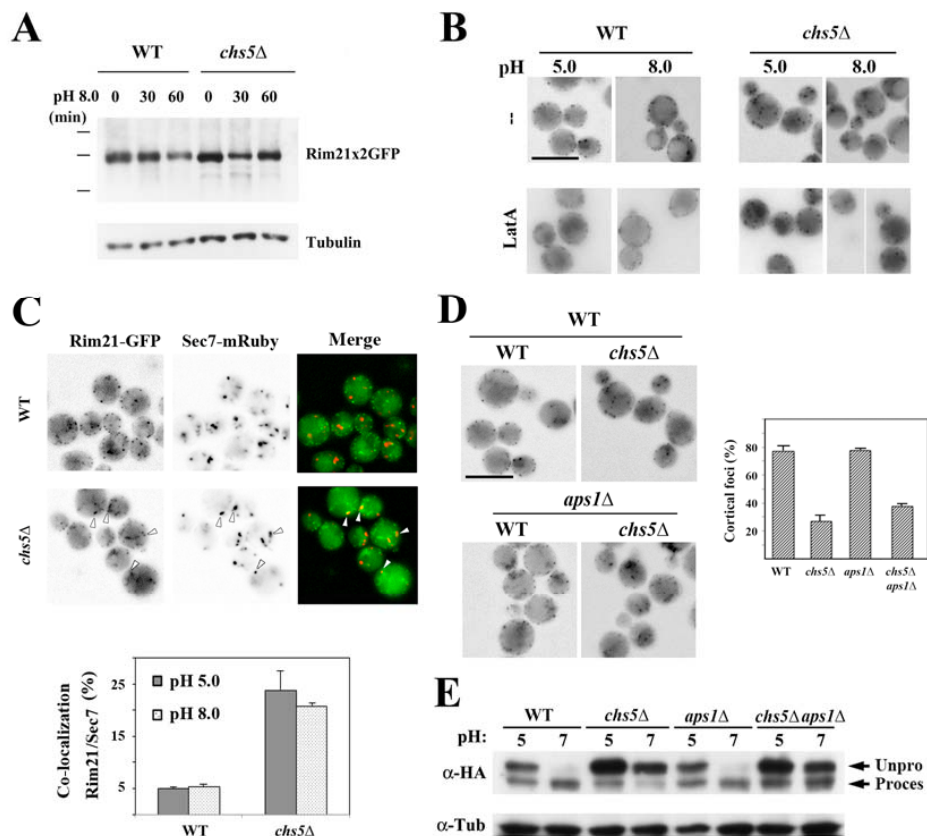


Fig S4: The behavior of Rim21 in the absence of exomer. (A) Rim21-2xGFP levels in the wild-type and *chs5Δ* strains after alkalization of the media. (B) Localization of Rim21-2xGFP foci in the indicated strains at acidic and alkaline pH, before and after endocytosis block with LatA for 1 hour. (C) Co-localization of Rim21-2xGFP and Sec7-mRuby in wild type and *chs5Δ* strains as indicated. Graph represents the levels of co-localization of the Rim21 foci with Sec7 spots at indicated pH. See the quantification procedure at the Materials and Methods section. (D) Localization of Rim21-2xGFP in the mutant strains at acidic pH. Quantitative results from two independent experiments (n>100) are represented in the graphs, which show percentage of foci associated to the PM. (E) Induction of the Rim101 processing at pH 7.0 in the indicated mutants. Rim101 processing was determined as described in the materials and methods.

Supplemental Materials

Genetics

Anton et al., 2018

Figure S1. A model for exomer assembly. Exomer is a heterotetrameric complex formed for a homodimer of Chs5 linked to a dimer of ChAPs. This complex interacts with two molecules of the Arf1 GTP-ase, an interaction required for the assembly of exomer at the TGN membrane. Two alternative forms of exomer complexes are depicted based on the distinct properties of the two ChAPs families. Binding of ChAP to cargo has only been demonstrated for Chs6/Chs3 (Rockenbauch et al., 2012; Weiskoff and Fromme, 2014) and Bch2/Pin2 (Ritz et al., 2014) therefore it is very likely that some exomer complexes do not bind cargo directly. Meanwhile, only Bch1 and Bud7 seem to be able to interact directly with membranes. The ChAP dimer can be assembled between the four different ChAPs proteins, Bch1, Bch2, Bud7 or Chs6, forming different homo- or heterodimers. However, to date there is no convincing evidence showing that all combinations of ChAPs exist in vivo. (See text for further details). The current model is based on several crystallographic studies (Paczkowski et al., 2012; Paczkowski and Fromme, 2014).

Figure S2. Characterization of *BCH2* overexpression. (A) Localization of *S. cerevisiae* bona fide cargoes after *BCH2* overexpression from the pJV30 plasmid. Chs3-GFP and Fus1-GFP are expressed from centromeric plasmid under the control of their own promoters. Pin2-GFP was tagged at the chromosome. (B) Effects of the overexpression of the different ChAPs with respect to calcofluor white (CW), 0.2M LiCl and 0.1M NH₄Cl sensitivity. Overexpression was achieved by growth in Galactose, where growth on Glucose appears similar to that of the null mutants. (C) Protein levels of the different ChAPs tagged with GFP at the chromosome. (D) Protein levels of Bch1 and Bud7 tagged at the chromosome from their native promoters (left panel) or under the control of the *GALI* promoter after growth in glucose or galactose (right panel). Both panels are from the same Western blot. The image is the same as in S3, but with a lower exposure level. Note the strong overexpression promoted after growth in galactose.

Figure S3. Characterization of Bch2. (A) Multiple alignment of the C-terminal regions of the four ChAPs present in *S. cerevisiae*. Note the single insertion in Bch2 that is described to contain a probable SH3 interaction domain (Tonikian et al., 2009).

Colored regions indicate the identity between ChAPs pairs; note the higher conservation in the Bch1/Bud7 pair. The scheme on the right indicates the regions of Bch2 deleted or exchanged in the next images. (B) Localization of the indicated protein tagged in the chromosome and their expression levels assessed by Western blot. Note the reduced levels of Bch2 Δ 118 protein in both assays. (C) Localization of the indicated tagged proteins after overexpression from the pGAL promoter and their expression levels assessed by Western blot. (D) Sensitivity to CW after the overexpression of the truncated forms of Bch2 as indicated. Note the absence of any effect after the deletion of the C-terminal regions of Bch2. Cultures were grown on Galactose plates (E) CW sensitivity after the overexpression of chimeric Bch1-Bch2 proteins.

Figure S4. Phylogenetic tree of the fungi Kingdom taken from MycoCosm. The number of ChAPs members identified in each group is indicated. ChAPs were identified using BLASTP and TBLASTN analysis on the published genomes from members of the different groups. BLAST analysis was performed twice, using ScBch1 and ScChs6 sequences independently.

Figure S5. Calcofluor white staining of *C. albicans* hyphae. (A) Hyphal growth was induced for 2 hours and then CW staining was performed on fixed cells as described in the Materials and Methods section. Parallel images were taken with DIC and fluorescence (DAPI filter). Single and merge images are presented. Fluorescence is presented as a gradient color. Note the larger size of the tip devoid of fluorescence in the *chs5* Δ mutant, indicative of a reduced deposition of chitin at the tip. (B) Quantification of the fluorescence intensity associated with CaChs3-GFP at the tip of the hyphae. Fluorescence intensity was measured along the tip of individual cells and values are referred to the fluorescence measured at the tip of each cell. Individual measurements are presented as spots, and average values (n=15) are represented by lines after being adjusted to fit a polynomial graph. Note the stronger polarization of the fluorescence in the wild-type hyphae compared to the more uniform distribution observed in the *chs5* Δ mutant.

MATERIAL SUPPLEMENTARIO/ SUPPLEMENTAL MATERIAL

Figure S6. Comparative analysis of Chs3 proteins of different origins. (A) Overall identity between ScChs3 and CaChs3 proteins. Note the reduced identity along the N-terminal cytosolic domain of the protein and also the longer C-terminal region of CaChs3. (B) Clustal W multiple alignment of the C-terminal regions of Chs3 from different fungi. Note the C-terminal extension detected in fungi outside the genus *Saccharomyces*. (C) Alignment of N-terminal regions of ScChs3 and CaChs3, note the divergence in the first amino terminal region and the absence of the proposed AP-1 binding domain (Starr et al., 2012) in the CaChs3 protein. (D) Alignment of C-terminal regions of ScChs3 and CaChs3, the region required for exomer binding is indicated (Rockenbauch et al., 2012). Regions marked with arrows in panels C and D indicate the segments of the proteins exchanged for constructing the CaNT Chs3-GFP and Chs3 CaCT -GFP chimeric proteins.

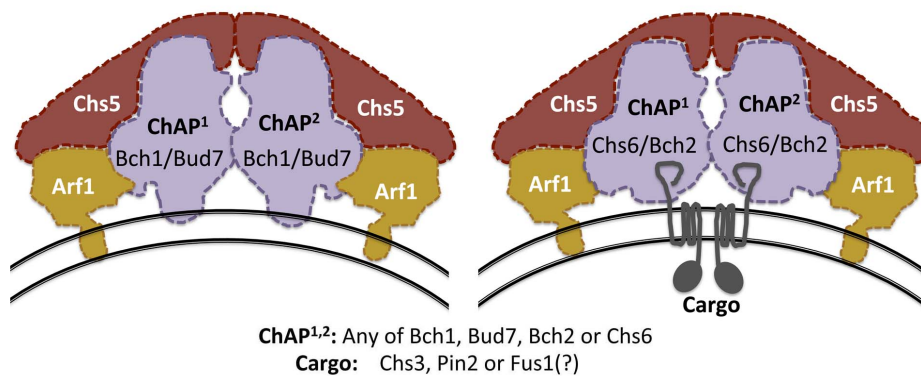


Figure S1

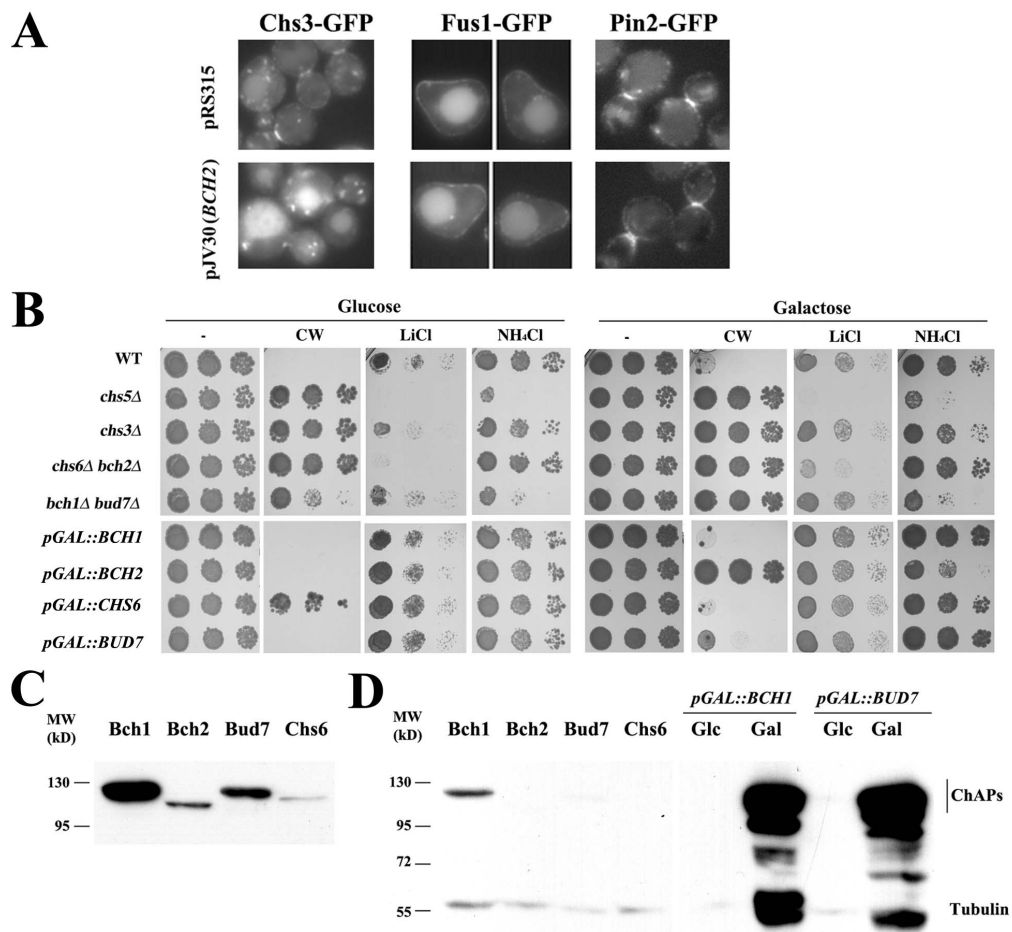


Figure S2

MATERIAL SUPPLEMENTARIO/ SUPPLEMENTAL MATERIAL

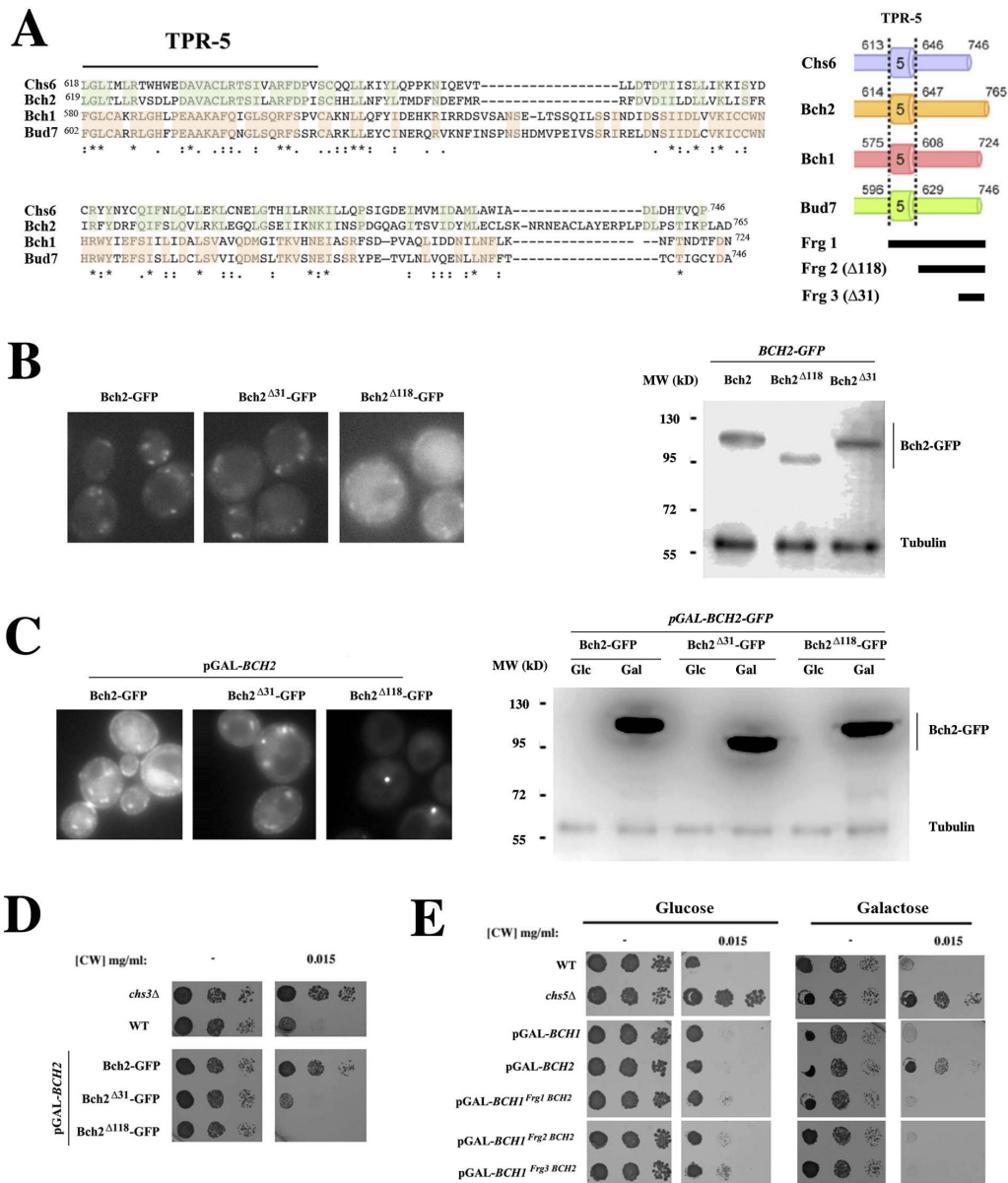


Figure S3

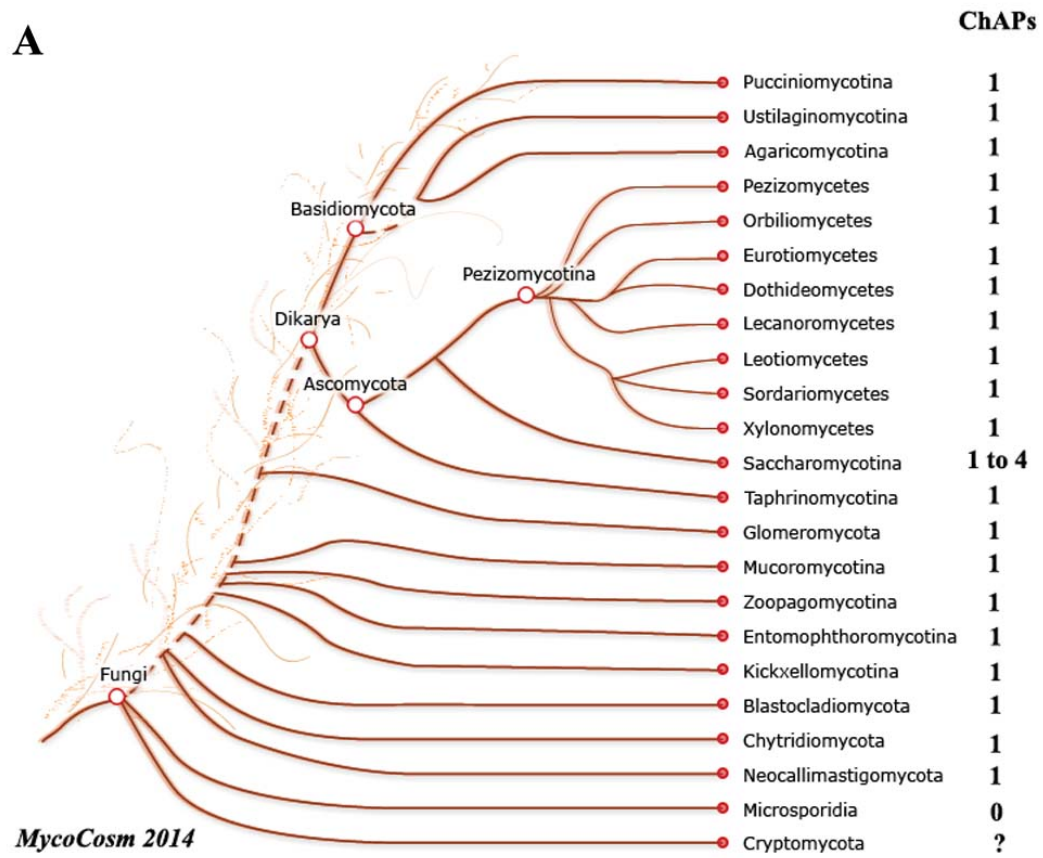


Figure S4

MATERIAL SUPPLEMENTARIO/ SUPPLEMENTAL MATERIAL

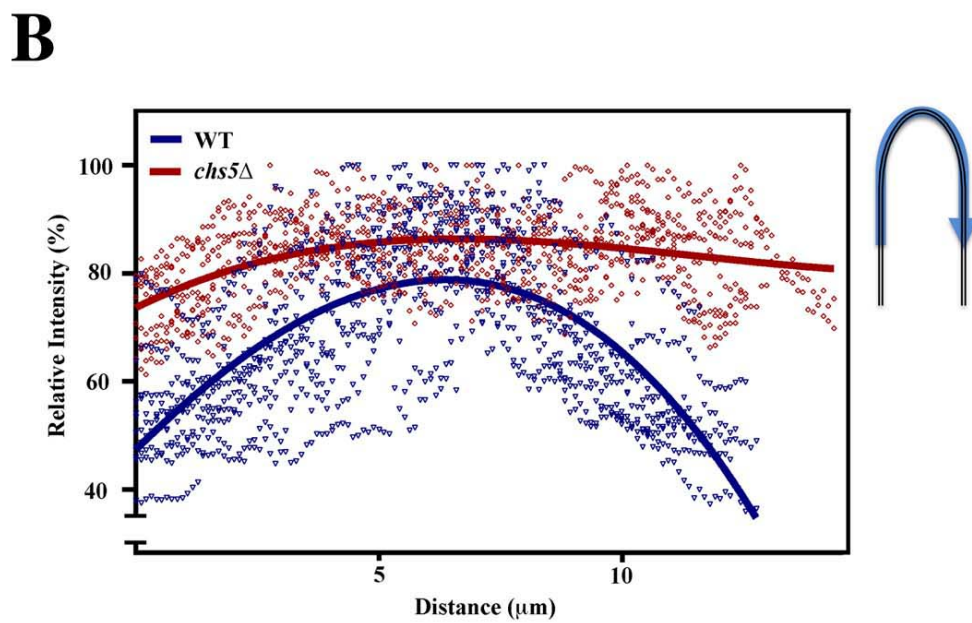
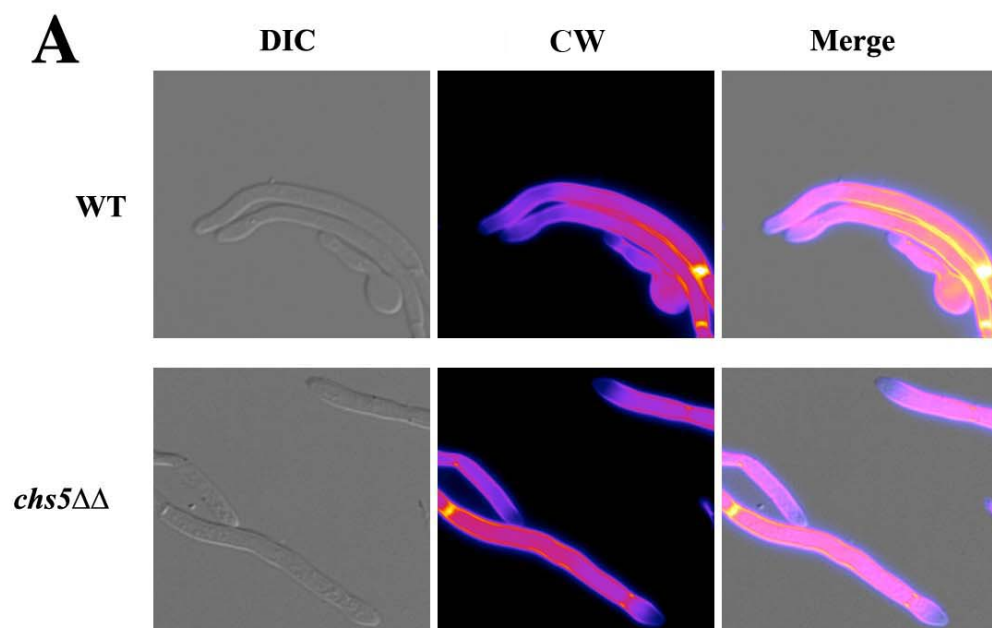


Figure S5

