



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA /IBFG

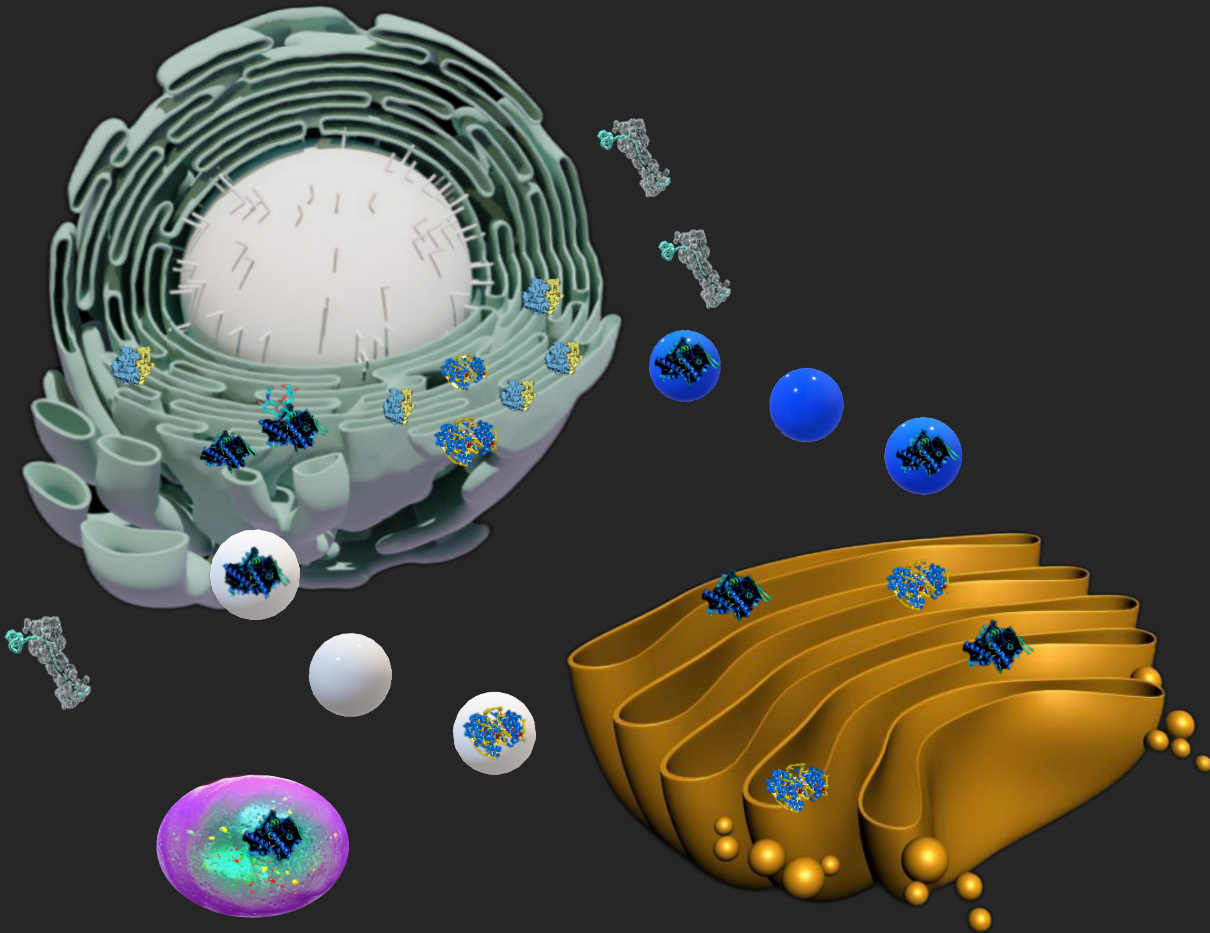


VNiVERSiDAD
DSALAMANCA

NOELIA SÁNCHEZ NÚÑEZ



CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL



Chs3 COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CONTROL DE CALIDAD EN LA RUTA SECRETORA

Salamanca, 2022





UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Microbiología y Genética

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

**Chs3 COMO MODELO PARA EL
ESTUDIO DEL CONTROL DE
CALIDAD EN LA RUTA
SECRETORA**

Tesis Doctoral

Noelia Sánchez Núñez

Salamanca, 2022

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "Chs3 como modelo para el estudio del control de calidad en la ruta secretora", presentada por Noelia Sánchez Núñez para optar al título de Doctora por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de Doctorado en Biología Funcional y Genómica, 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 14 de febrero de 2022.

DIAZ MARTINEZ
MARGARITA
MARIA -
16534322J

Firmado digitalmente por
DIAZ MARTINEZ
MARGARITA MARIA -
16534322J
Fecha: 2022.02.14 16:58:17
+01'00'

Fdo: Margarita Díaz Martínez
Secretaria de la Comisión Académica del Programa de Doctorado



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada "Chs3 como modelo para el estudio del control de
calidad en la ruta secretora", presentada por Noelia Sánchez Núñez para optar al
título de Doctora por la Universidad de Salamanca, dentro del programa de
Doctorado en Biología Funcional y Genómica, 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 14 de Febrero de
2022.

Fdo: César Roncero Maíllo

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de poner fin a una etapa que ha cambiado mi vida y me ha hecho crecer no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal. Ha sido inolvidable y al mismo tiempo muy dura. Por eso, me gustaría agradecer a toda la gente que directa o indirectamente ha puesto su granito de arena para que yo haya llegado hasta aquí.

Me gustaría empezar primero por la gente de mi laboratorio. Gracias Carlos por enseñarme muchas de las cosas que aprendí nada más llegar. Has sido y eres un ejemplo para mí no solo a nivel profesional, sino también a nivel personal. Se te echa de menos. En segundo lugar, a Charo por ayudarme en todo y compartir conmigo tanto los buenos momentos como esos días en los que no sale nada porque esto es así. Gracias por poner esa nota de humor y alegría cuando a veces me falta a mí. Lo haces todo más fácil. Por último, a César por ser como un guía para mí, aconsejarme y hacerme mejorar día a día, aunque todavía me falte mucho por aprender. Recuerdo también con un cariño especial a muchas de las personas que han pasado por este edificio rojo y con las que he tenido el placer de compartir muchos momentos. Los Danis, Fran, Alicia y en especial a Tomás por su energía y su forma de transmitirla. Os echo mucho de menos. Además, me gustaría agradecer por su apoyo en esta última etapa, más difícil para mí y en la que ya se me había ido mucha gente importante, a Rubén y a María R., 2 grandes personas que me van a tener siempre que me necesiten. En especial agradecer a María R. por su apoyo y por todos los momentos compartidos. Vales mucho. No lo olvidéis.

Fuera de este edificio también me gustaría agradecer a mis Anas del pádel. Os conozco desde hace poco, pero me basta para saber que sois 2 personas maravillosas con las que espero seguir compartiendo esos ratitos de distracción tan necesarios a veces.

Por otro lado, me gustaría agradecer a mi familia por ser mi toma de tierra y estar siempre para mí cuando lo necesito. Gracias mamá por ser el eje de mi vida. Y ¿cómo no? A mis amigos: Óscar, Miriam, María T. y Sira. En especial a estas dos últimas. Gracias María T. por todos los momentos compartidos (todavía recuerdo esas tardes de domingo), por tu generosidad, por escucharme y ser incondicional. Eres increíble, te adoro y lo haré siempre. Sira, ¿qué voy a decir de ti? Creo que tienes un talento para hacerme sentir bien, siempre tan positiva, siempre tan graciosa, tan llena de vida y tan dispuesta a ayudar. Ojalá hubiera más gente como tú. No cambies nunca, te quiero.

Dejo para el final a las dos personas más importantes de mi vida. Una ya no está, pero su ejemplo me inspira día a día para seguir luchando y para ser una mejor persona. Gracias abuela, te llevo en el corazón. Ojalá hubiéramos podido compartir más tiempo juntas. No te olvidaré nunca. La otra persona, a la que he tenido la oportunidad de conocer de cerca en esta etapa, es sin lugar a duda la que más me ha hecho evolucionar a nivel personal en los últimos años. Gracias Natalia porque sin ti nada hubiera sido lo mismo. Gracias por todos los momentos de risas, de complicidad, de debate o de simplemente hablar de gilipolleces. Ni utilizando todas las páginas que tiene esta tesis (que ha quedado bastante larga, por cierto) podría expresar todo lo que significas para mí. Eres única y maravillosa. Te adoro amiga, siempre.

Por último, me gustaría agradecer a la ciencia. Sí, aunque suene un poco abstracto. A ella porque me ha permitido ilusionarme día a día, porque ha sido casa cuando otras partes de mi vida no funcionaban o estaban mal. Gracias compañera, aunque a veces no haya quién te entienda. Espero que este camino que nos ha unido continúe por mucho tiempo. Como dice la canción "No me importa la distancia ni kilómetros por recorrer".

Y ahora sí. Abran fuego, empieza el baile.

Abreviaturas, siglas y acrónimos

AAPs	Aminoácido permeasas (<i>Amino acid permeases</i>)
ADP	Adenosín di-fosfato (<i>Adenosine diphosphate</i>)
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
AP	Complejo proteico adaptador (<i>Adaptor Protein complex</i>)
ARF	Factor de ADP-ribosilación (<i>ADP-Ribosylation Factor</i>)
APC/C	Complejo Promotor de la Anafase (<i>Anaphase-promoting complex</i>)
ART	<i>Arrestin-related trafficking adaptor</i>
ATG/Atg	<i>Autophagy related gene</i>
BIFC	Complementación bimolecular de fluorescencia (<i>Bimolecular Fluorescence Complementation</i>)
BN-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas (<i>Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
ChAP	Proteínas de unión a Chs5 y Arf1 (<i>Chs5 and Arf1 binding proteins</i>)
CHIP	<i>Carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein</i>
CME	Endocitosis mediada por clatrina (<i>Clathrin Mediated Endocytosis</i>)
CNX	Calnexina (<i>Calnexin</i>)
CORVET	<i>Class C core vacuole/endosome tethering</i>
COPI	Proteína de cubierta COPI (<i>Coat Protein Complex I</i>)
COPII	Proteína de cubierta COPII (<i>Coat Protein Complex II</i>)
CPY	Carboxipeptidasa Y (<i>Carboxipeptidase Y</i>)
CRT	Calreticulina (<i>Calreticulin</i>)
CW	Calcoflúor blanco (<i>Calcofluor White</i>)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DSP	(<i>Dithiobis (Succinimidyl Propionate)</i>)
DTT	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
EE	Endosoma temprano (<i>Early Endosome</i>)
ER/RE	<i>Endoplasmic Reticulum</i> / Retículo Endoplásmico
ERAD	Degradación asociada al RE (<i>ER-Associated protein Degradation</i>)

ERES	Sitios de salida del retículo endoplásmico (<i>ER exit sites</i>)
ERGIC	<i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>
ERQC	Control de calidad del RE (<i>ER Quality Control</i>)
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPasa (<i>GTPase Activating Protein</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>
Glc	Glucosa (<i>Glucose</i>)
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
Gls	Glicosidasa (<i>Glicosidase</i>)
GPI	Glucosil fosfatidil inositol
GQC	Control de calidad del Golgi (<i>Golgi Quality Control</i>)
HOPS	<i>Homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
Hsp	Proteína de respuesta a choque térmico (<i>Heat Shock Protein</i>)
ILVs	Vesículas intraluminales (<i>Intra-lumenal vesicles</i>)
INMAD	Degradación asociada a la membrana nuclear interna (<i>Inner Nuclear Membrane-Associated Degradation</i>)
LB	Medio rico para <i>E. coli</i> (<i>Luria-Bertani media</i>)
LE	Endosoma tardío (<i>Late Endosome</i>)
Man	Manosa (<i>Mannose</i>)
MNI/INM	Membrana nuclear interna / <i>Inner Nuclear Membrane</i>
MP/PM	Membrana plasmática / <i>Plasma Membrane</i>
MVB	Cuerpo multivesicular (<i>Multivesicular Body</i>)
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
OST	Oligosacariltransferasa (<i>Oligosaccharyltransferase</i>)
PAT	Palmitoiltransferasa (<i>Protein acyl-transferase</i>)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PDI	Proteína disulfuro isomerasa (<i>Protein Disulfide Isomerase</i>)

PI3P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PI3,5P₂	Fosfatidil inositol 3,5-bisfosfato
PI4P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PI4,5P₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PMQC	Control de calidad de la MP (<i>Plasma Membrane Quality Control</i>)
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo (<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
PVC	Compartimento Prevacuolar (<i>Prevacuolar Compartment</i>)
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
QC	Control de calidad (<i>Quality Control</i>)
SD	Medio sintético definido
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
SGA	<i>Synthetic Genetic Array</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SRP	Partícula de reconocimiento de señal (<i>Signal Recognition Particle</i>)
TAE	Tampón Tris-Acético EDTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red Trans del Golgi (<i>Trans-Golgi Network</i>)
TM	Transmembrana (<i>Transmembrane</i>)
tFT	<i>Timer</i> fluorescente en tándem (<i>tandem Fluorescent Timer</i>)
TRAPP	<i>TRAnsport Protein Particle</i>
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UPS	Sistema/Ruta ubiquitina-proteasoma (<i>Ubiquitin Proteasome System</i>)
WT	Cepa o condiciones silvestres (<i>Wild Type</i>)
YEPD	Medio de crecimiento rico (<i>Yeast Extract, Peptone, Dextrose</i>)
YNB	<i>Yeast Nitrogen base</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. TRÁFICO INTRACELULAR.	3
1.1. LA RUTA SECRETORA. UNA VISIÓN GENERAL.....	3
1.2. TRANSPORTE VESICULAR.	4
1.3. LA RUTA SECRETORA TEMPRANA. DESDE EL RE.....	6
1.4. LA RUTA SECRETORA TARDÍA.	9
2. MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD A LO LARGO DE LA VÍA SECRETORA. ..	18
2.1. CONTROL DE CALIDAD EN EL RE (ERQC).....	18
2.2. SEÑALES IMPLICADAS EN EL ERQC.	20
2.3. EL SISTEMA ENCARGADO DE FACILITAR EL PLEGAMIENTO: CHAPERONAS Y OTROS FACTORES DE PLEGAMIENTO.....	21
2.4. SISTEMAS DE ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS DESPLEGADAS DEL RE.	22
2.4.1. ERAD.	23
N-GLICOSILACIÓN COMO SEÑAL REGULADORA DEL ACCESO A ERAD.	26
2.4.2. INMAD y control de calidad nuclear.....	29
2.4.3. RETICULOFAGIA (AUTOFAGIA DEL RE).	31
2.5. CONTROL DE CALIDAD EN EL GOLGI (GQC).....	32
2.6. CONTROL DE CALIDAD EN LA MP O PMQC.....	34
2.7. RESUMEN DE SISTEMAS DE QC.....	35
3. SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y Chs3 COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR.	37
3.1. Tráfico intracelular de Chs3 en <i>S.cerevisiae</i>	37
3.2. Topología y señales implicadas en el tráfico intracelular de Chs3.....	40
3.3. Control de calidad de Chs3. Antecedentes.	41

OBJETIVOS.....	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
CAPÍTULO I: ESTUDIO DE LOS MECANISMOS Y SEÑALES IMPLICADAS EN EL CONTROL DE CALIDAD DE Chs3.	49
1. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. HERRAMIENTAS ALTERNATIVAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS POLITÓPICAS.	51
2. ESTUDIO PRELIMINAR DEL TRÁFICO INTRACELULAR Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS QUIMERAS DE Chs3.	53
2.1. Búsqueda masiva para la identificación de dianas implicadas en la degradación de las quimeras de Chs3.	56
3. ANÁLISIS DEL QC DE Chs3.	60
3.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS DISTINTOS DOMINIOS DE Chs3 EN SU CONTROL DE CALIDAD.	60
3.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA PALMITOILACIÓN SOBRE EL TRÁFICO Y EL QC DE Chs3.	64
3.3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA N-GLICOSILACIÓN DE Chs3 SOBRE SU CONTROL DE CALIDAD.	66
3.4. EL PAPEL DEL DOMINIO LUMINAL DE Chs3 EN EL CONTROL DEL PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA Y SU SALIDA DEL RE.....	81
4. FRAGMENTO 1. LA AGREGACIÓN COMO UN MECANISMO DE QC BENEFICIOSO PARA LA CÉLULA.	82
5. MODELO GENERAL DE LOS DOMINIOS Y SEÑALES IMPLICADAS EN EL QC DE Chs3.	84
CAPÍTULO II: LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Chs3-Chs7 Y LA PROPIA OLIGOMERIZACIÓN DE Chs3 REGULAN SU TRÁFICO A LO LARGO DE LA RUTA SECRETORA.....	87
1. ANÁLISIS PRELIMINAR DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.....	89
1.1. Análisis del dominio N-terminal de Chs3 en la ruta de tráfico directo a la vacuola.	90
1.2. Búsqueda masiva para el análisis del tráfico y del QC de Chs7 en función de la formación del complejo Chs3-Chs7.....	92

2. ANÁLISIS DEL TRÁFICO INDEPENDIENTE A LA VACUOLA DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.....	94
2.1. Análisis de la vía autofágica.....	94
2.2. Chs7 y la quimera Δ^{126} Chs3 no alcanzan la vacuola por medio del complejo AP-3 o la ruta CPY.....	95
2.3. El tráfico independiente a la vacuola de Chs7 y Δ^{126} Chs3 no pasa por la MP.....	96
2.4. La vía alternativa a la vacuola que siguen Chs7 y la quimera Δ^{126} Chs3 cuando no se forma el complejo Chs7-Chs3/ Δ^{126} Chs3 es dependiente del ESCRT.....	98
3. ANÁLISIS DE LA SALIDA DEL RE DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.....	100
3.1. Chs7 y Δ^{126} Chs3 salen del RE en vesículas COPII.....	100
3.2. El receptor Erv14 es necesario para la salida del RE de Chs7, pero no de Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7.....	102
3.3. La reducida agregación de Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7 facilita su salida del RE por <i>bulk flow</i>	103
4. ANÁLISIS DEL TRÁFICO EN EL GOLGI Y POST-GOLGI DE Chs7.....	105
4.1. En ausencia de Chs3, Chs7 es reciclada al RE por el receptor Erv46 en vesículas COPI.....	105
4.2. La interacción de Chs7 con Chs3 condiciona su clasificación y distribución desde el TGN.....	107
4.3. La llegada de Chs7 a la vacuola en ausencia de Chs3 se ve afectada en un mutante de la desubiquitinasa Ubp3.....	110
5. UN MODELO PARA EL TRÁFICO DE Chs7.....	111
5.1. Tráfico de Chs7 en presencia de Chs3.....	111
5.2. Tráfico de Chs7 en ausencia de Chs3.....	112
6. ANÁLISIS DEL TRÁFICO EN EL GOLGI Y EN COMPARTIMENTOS POST-GOLGI DE LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.....	114
6.1. La quimera Δ^{126} Chs3 es reconocida en el cis-Golgi desde donde es reciclada al RE en vesículas COPI.....	114
6.2. Del TGN/EE a la vacuola. Análisis del tráfico independiente de Δ^{126} Chs3.....	117
7. Chs7 ES NECESARIA PARA LA LLEGADA DE Chs3 A LA MP. LA QUIMERA Δ^{126} Chs3 COMO MODELO.....	121

DISCUSIÓN GENERAL	125
1. El plegamiento de Chs3 se encuentra estrechamente regulado en el RE y depende de distintos dominios de la proteína.....	127
2. La N-glicosilación de Chs3 regula el plegamiento de la proteína en el RE previniendo su acceso a ERAD/INMAD.	128
3. Modelo para el plegamiento de Chs3 en el RE.....	130
4. Chs7. Una chaperona peculiar.....	131
5. La monitorización de la formación del complejo Chs3-Chs7 y de la oligomerización de Chs3 se realiza a múltiples niveles en la vía secretora e influye en la localización de ambas proteínas.	134
5.1. Rutas alternativas a la vacuola como un mecanismo de QC en el TGN/EE.....	136
5.2. La interacción efectiva con el exómero depende de ambos componentes del complejo Chs3-Chs7.....	137
CONCLUSIONES	143
MATERIALES Y MÉTODOS	147
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.	149
2. MEDIOS DE CULTIVO.	150
2.1. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	150
2.2. Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	150
2.3. Medios suplementados con drogas/inhibidores.	151
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.	151
3.1. Extracción de ADN.	151
3.2. Procesamientos enzimáticos del ADN.	152
3.3. Electroforesis.....	152
3.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).	152
4. VECTORES EMPLEADOS	153
4.1. Vectores de <i>E.coli</i>	153
4.2. Vectores de <i>S.cerevisiae</i>	153
5. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIÓNES.	156

5.1. Microscopía de fluorescencia.....	156
5.2. Microscopía confocal.....	157
6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	158
6.1. Tratamientos previos a la extracción de proteínas.....	158
6.2. Obtención de extractos de proteínas.....	158
6.3. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección.....	159
6.4. Blue Native Page (BN-Page).....	160
6.5. Ensayos de cross-linking.....	160
7. ANÁLISIS PARA MEDIR ESTABILIDAD Y ABUNDANCIA DE PROTEÍNAS.	161
7.1. Búsqueda masiva de dianas implicadas en la degradación de nuestras proteínas..	161
8. ANÁLISIS DE DATOS.....	165
BIBLIOGRAFÍA	167
ANEXO	181
PARTE 1. CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS.....	183
PARTE 2. CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.	185
PARTE 3. FIGURAS ADICIONALES.	197

INTRODUCCIÓN

1. TRÁFICO INTRACELULAR.

El tráfico intracelular comprende un conjunto de mecanismos y procesos conservados destinados a asegurar la correcta llegada de cada molécula de la célula a su compartimento final de destino en el que lleva a cabo su función. La alteración en el tráfico intracelular de proteínas es la causante de una gran variedad de enfermedades humanas (Aridor & Hannan, 2002; Wang et al., 2014) por lo que su estudio es de una considerable importancia.

1.1. LA RUTA SECRETORA. UNA VISIÓN GENERAL.

La ruta secretora fue la primera vía de tráfico caracterizada gracias al trabajo realizado en levaduras en el laboratorio de Randy Schekman durante la década de 1980. En torno a un tercio del proteoma de las células eucariotas sigue esta ruta (Ghaemmaghami et al., 2003) encontrándose entre ellas las proteínas transmembrana (TM) que constituyen entre un 20-30% del proteoma celular y cumplen funciones esenciales en la célula (Shao & Hedge, 2011).

Inicialmente, las proteínas que siguen la vía secretora se dirigen al retículo endoplásmico (RE) donde se translocan hacia el lumen o membrana del RE. Esta translocación puede ser posterior a su síntesis (mecanismo post-traducciona) o ir ligada directamente a su síntesis en los ribosomas (mecanismo co-traducciona). En general, las proteínas integrales de membrana y con secuencias señal de alta hidrofobicidad utilizan el mecanismo co-traducciona (vía dependiente de SRP: Signal Recognition Particle), mientras que proteínas solubles o TM pequeñas y con secuencias señal de baja hidrofobicidad normalmente se translocan post-traduccionalmente (revisado en Barlowe & Miller, 2013). La translocación co-traducciona se produce a través del translocón Sec61, mientras que la post-traducciona requiere del complejo GET (levaduras) /TRC40 (mamíferos) (revisado en Shao & Hedge, 2011).

En el RE tienen lugar distintos procesos que resultan claves para la funcionalidad y el adecuado tráfico de la proteína hacia compartimentos posteriores. Entre estos procesos cabe destacar el plegamiento de las proteínas, la adquisición de ciertas modificaciones postraduccionales como la N-glicosilación o la lipidación y la oligomerización y/o ensamblaje en el caso de complejos multiméricos. Todos estos procesos se consideran a su vez parte de los sistemas de control de calidad celular y los llevan a cabo chaperonas y determinadas enzimas que se encargan de asegurar que la proteína/complejo alcance el estado conformacional adecuado que permita su salida del RE.

Cuando las proteínas (o complejos) son competentes para la exportación, se incorporan en vesículas de transporte denominadas COPII (COat Protein Complex II) para su transporte hacia el compartimento más proximal del aparato de Golgi o cis-Golgi. Una vez allí, estas proteínas pueden ser recicladas de vuelta al RE en vesículas COPI (COat Protein Complex I), o bien avanzar hasta la denominada cara trans del Golgi o TGN (Trans-Golgi Network) desde donde son direccionadas a su destino final, ya sea la membrana plasmática (MP), el medio extracelular, los endosomas o la vacuola (**Figura 1**). A su vez, muchas de las proteínas que alcanzan la membrana plasmática son posteriormente endocitadas, bien para ser recicladas de vuelta al TGN, o bien para ser dirigidas a la degradación en la vacuola.

Además, es importante resaltar el carácter bidireccional de la ruta secretora que permite preservar la identidad molecular de los orgánulos y a su vez mantener el correcto funcionamiento de la vía (Lee et al., 2004).

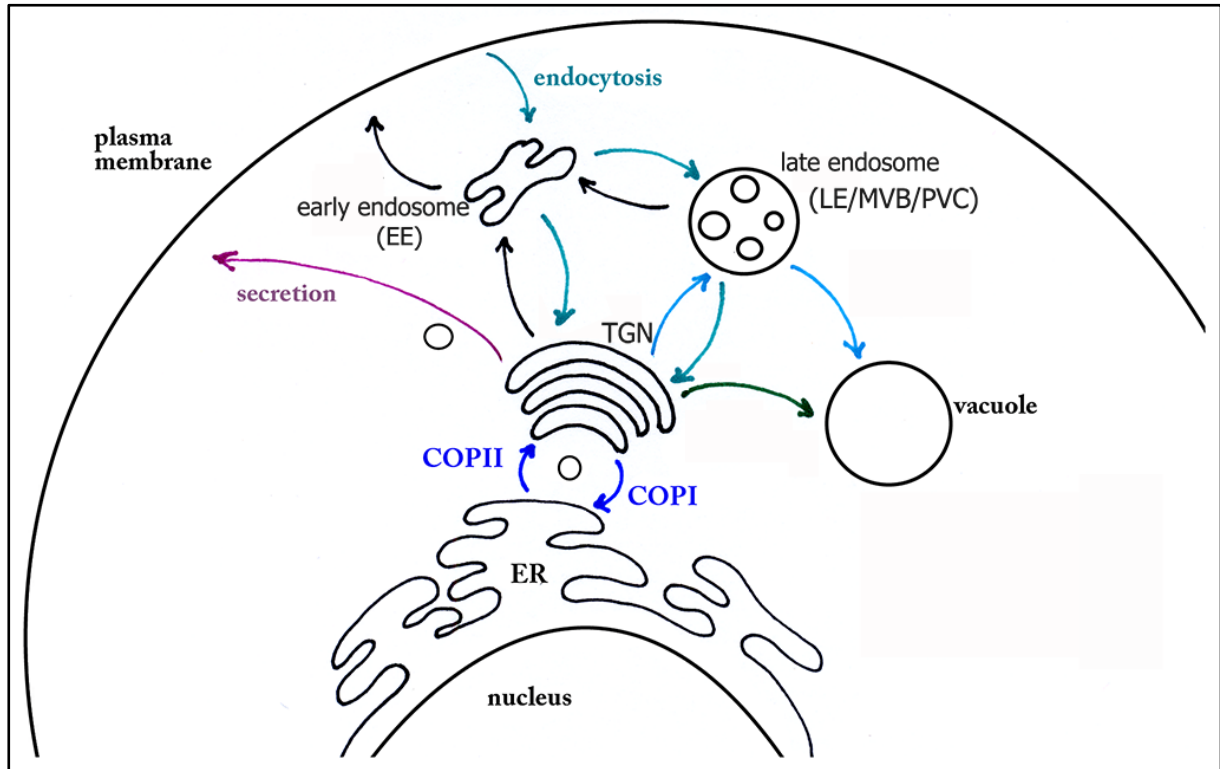


Figura 1. Vía secretora en levaduras. Adaptado de (Hecht et al., 2014).

A continuación, daremos una visión general del transporte vesicular y de los componentes que participan en él, para después detallar la ruta secretora, que se puede dividir en dos fases, una temprana y otra tardía de acuerdo con el avance a través de la ruta.

1.2. TRANSPORTE VESICULAR.

A lo largo de la ruta secretora las moléculas viajarían en vesículas desde un compartimento donador a un compartimento aceptor de acuerdo con la teoría del transporte vesicular (Palade, 1975).

Las etapas en la vida de una vesícula se pueden resumir en cuatro: concentración del cargo, gemación de la vesícula, transporte de la vesícula y reconocimiento y fusión con el compartimento aceptor. En cada una de estas etapas se requiere la acción de una serie de familias de proteínas cuyas funciones y características se resumen aquí:

- **GTPasas:** Son los reguladores maestros del tráfico vesicular. Estas proteínas G alternan entre dos conformaciones, una activa en la que se encuentran unidas a GTP (Guanosine Triphosphate) y una inactiva unidas a GDP (Guanosine Diphosphate), cambiando de una conformación a otra en base a la acción de 2 tipos de factores: GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) y GAPs (GTPase-Activating Proteins).

Los GEFs facilitan el intercambio de GDP por GTP, mientras que las GAPs promueven la hidrólisis del GTP a GDP. Las GTPasas que participan en el tráfico intracelular pertenecen a las familias Rab/Ypt, Arf y Rho. Su función es la de reclutar en su conformación activa a distintos efectores del transporte vesicular participando así en todas las etapas de ese transporte de forma directa o indirecta: median el ensamblaje de cubiertas, la formación de vesículas, su movimiento, así como el reconocimiento y fusión con la membrana del compartimento aceptor (revisado en Lipatova et al., 2015).

- Cubiertas proteicas y adaptadores: Median el proceso de selección de los cargos y en el caso de las cubiertas también la gemación de vesículas (Bonifacino & Glick, 2004). En algunos casos el reconocimiento entre el cargo y la cubierta no se produce de forma directa, sino indirecta, a través de los denominados adaptadores de cargo, proteínas transmembrana que pueden interaccionar tanto con el cargo como con las cubiertas.
- Citoesqueleto y proteínas motoras: Tanto los cables de actina como los microtúbulos y las proteínas motoras que se mueven sobre estos participan en el desplazamiento de las vesículas desde un compartimento a otro (revisado en Cai et al., 2007). En el caso en el que las distancias entre compartimentos son muy pequeñas, como ocurre entre el RE y el complejo de Golgi en levaduras, el papel del citoesqueleto no parece importante y, de hecho, se ha propuesto que existe un contacto físico directo entre las membranas de estos compartimentos (Kurokawa et al., 2014).
- Factores “amarra” (Tethering factors), proteínas SM y SNAREs: Los factores amarra pueden ser de distinto tipo y se encuentran en el compartimento receptor siendo los responsables tanto de concentrar a las SNAREs como de formar un puente entre la vesícula y la membrana, siendo reclutados a partir de las GTPasas Rab presentes en la vesícula (revisado en Cai et al., 2007). Se piensa que estos factores también reconocen a la cubierta antes de que esta se desensamble para que tenga lugar la fusión.

Las proteínas de la familia SM (Sec1-Mun8) contribuyen con los factores amarra al ensamble del complejo SNARE actuando como chaperonas moleculares. Las proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein REceptor) son proteínas TM que median la fusión entre la vesícula y el compartimento aceptor. Pueden ser de dos tipos: v-SNAREs y t-SNAREs. Las v-SNAREs se encuentran en la vesícula, mientras que las t-SNAREs se encuentran en las membranas del compartimento diana. La interacción entre v-SNARE y t-SNARE provoca el acercamiento entre membranas y la posterior fusión (revisado en Wang et al., 2017).

Por último, es importante señalar que, aunque inicialmente se pensaba que todo el tráfico entre orgánulos se daba por medio de vesículas, se han descrito intermediarios de transporte con otras morfologías como es el caso de las estructuras tubulares que se generan en el transporte post-Golgi y endosomal (De Matteis & Luini, 2008; Hierro et al., 2015). Si bien estos intermediarios siguen cumpliendo los principios básicos de la teoría vesicular.

1.3. LA RUTA SECRETORA TEMPRANA. DESDE EL RE.

El retículo endoplásmico es el punto de partida de la ruta secretora. Allí, tras la translocación de las proteínas, tienen lugar toda una serie de procesos de control de calidad (QC="Quality Control"): el proceso de plegamiento, la adquisición de determinadas modificaciones postraduccionales, así como la oligomerización y/o el ensamblaje en el caso de los complejos de proteínas. Estos procesos forman parte del llamado ERQC (Endoplasmic Reticulum Quality Control) siendo esenciales para el buen funcionamiento celular y ahondaremos en ellos en el capítulo siguiente. En todo caso, el objetivo final de los mismos es que la proteína o complejo adquiera la conformación adecuada competente para su salida del RE.

1.3.1. Salida del RE en vesículas COPII.

Las proteínas/complejos competentes para el exporte se concentran en dominios especializados del RE denominados ERES (ER Exit Sites), en donde se produce su asociación con la cubierta COPII que es la encargada del transporte hasta el siguiente compartimento, el aparato de Golgi. El número y distribución espacial de los ERES varía entre especies, aunque parece haber un acuerdo en cuanto a su organización en las cercanías del cis-Golgi (revisado en Kurokawa & Nakano, 2019). En los ERES se acumulan principalmente GTPasas, proteínas de cubierta COPII, adaptadores y receptores de carga. La proteína Sec16 juega un papel central en la organización de estos ERES (revisado en Budnik & Stephens, 2009) donde además regula el *turnover* de COPII (Yorimitsu & Sato, 2012).

El ensamblaje de la cubierta COPII en los ERES se inicia con el reclutamiento local y activación de la GTPasa Sar1. Esta es activada por el GEF Sec12, de manera que Sar1-GTP recluta a la capa interna de la cubierta formada por el heterodímero Sec23-Sec24. Posteriormente el complejo formado por Sar1, Sec23 y Sec24 recluta a la parte externa de la cubierta, el complejo heterotetramérico formado por Sec13 y Sec31 (revisado en Budnik & Stephens, 2009) (**Figura 2**). Mientras que la capa interna se encarga de la unión y reconocimiento del cargo, la externa proporciona la fuerza necesaria para la gemación de la vesícula.

El reconocimiento del cargo por la cubierta COPII se puede producir por tres mecanismos distintos. El primero, para cargos TM, se daría por la interacción directa del cargo a través de motivos di-hidrofóbicos o di-acídicos con Sec24 (Barlowe, 2003; Miller et al., 2003). El segundo, que se puede dar tanto en el caso de cargos solubles como TM, es aquel en el que el reconocimiento se da de forma indirecta a través de los denominados receptores de carga (Pagant et al., 2015). Para algunos cargos estos dos primeros mecanismos se combinan siendo estos reconocidos por medio de interacciones tanto con un receptor de carga como con la propia cubierta. El tercer mecanismo es aquel en el que los cargos son capaces de ser incluidos en las vesículas junto a la fase fluida y de membrana del RE sin necesidad de receptores o señales de exporte en un proceso pasivo conocido como *bulk flow* (Barlowe & Helenius, 2016).

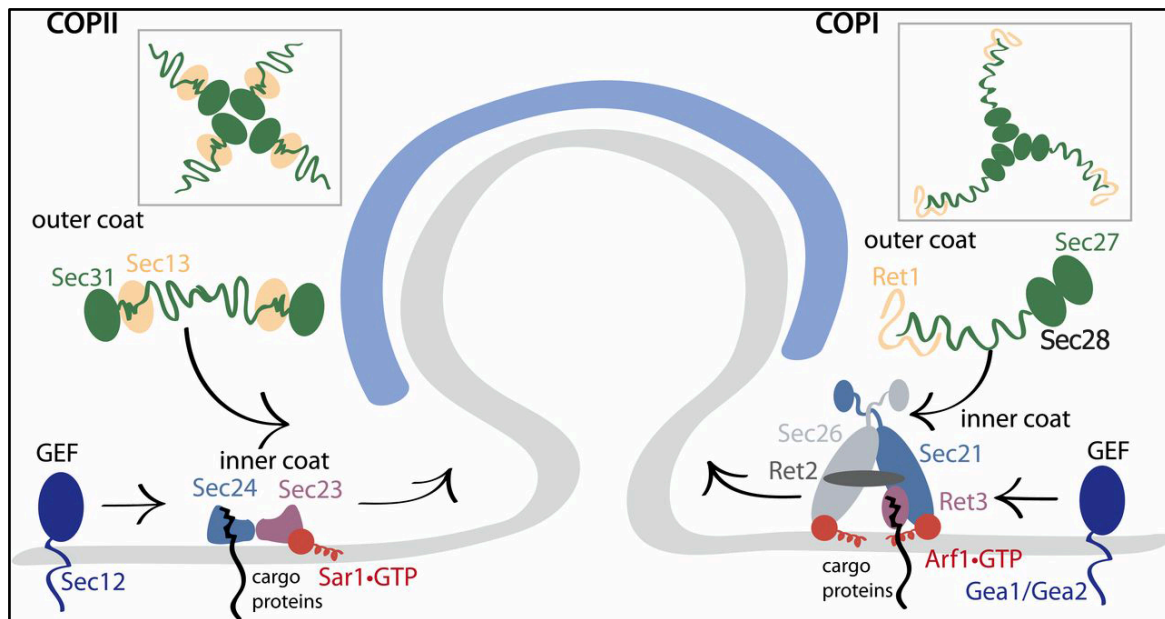


Figura 2. Ensamblaje de cubiertas COPII y COPI. Adaptado de (Barlowe & Miller, 2013).

Los receptores de carga son proteínas TM que reconocen por un lado al cargo y por otro a la cubierta, al contener también los dominios necesarios para la interacción con COPII. Estos receptores se engloban en las vesículas de transporte, ciclando entre el RE y cis-Golgi, al poder ser reciclados desde este último al RE tras la liberación del cargo (Dancourt & Barlowe, 2010). Los receptores de carga en levaduras incluyen a las proteínas de la familia p24, a la proteína Emp47 y a varias proteínas Erv (ER vesicle protein): Erv29, Erv14, Erv26 y Erv41-Erv46. Entre estos últimos, Erv29 media el reconocimiento de cargos solubles, mientras que Erv26 es necesario para el transporte de algunas proteínas TM de tipo II; por el contrario, el receptor Erv14 es necesario para el transporte de un gran número de proteínas TM (Herzig et al., 2012). Emp47 se encarga del transporte de glicoproteínas, mientras que las proteínas p24 son los receptores de carga para proteínas ancladas a GPI (Glycosylphosphatidylinositol) (revisado en Barlowe & Helenius, 2016). El único cargo descrito hasta el momento para el hetero-oligómero Erv41-Erv46 es la manosil-transferasa del Golgi Ktr4, a la cual reconoce a través de su dominio luminal (Noda et al., 2014). Sin embargo, parece que este receptor actúa fundamentalmente como un receptor de transporte retrógrado en el cis-Golgi permitiendo la recuperación de proteínas del RE que no portan señales KDEL en humanos o HDEL en levaduras (Shibuya et al., 2015; Keiser & Barlowe, 2020).

Tras la liberación de las vesículas COPII, y según el modelo tradicional, estas viajan hasta anclarse y fusionarse con el compartimento cis del Golgi en levaduras (ERGIC en mamíferos). Este anclaje viene marcado por la acción de la GTPasa Ypt1 (Rab1 en mamíferos), el factor amarra del tipo *coiled-coil* Uso1 (p115 en mamíferos) y el complejo TRAPPI (Transport Protein Particle I). Una vez que la vesícula COPII se ha formado y Sar1 se ha liberado, Sec23 recluta al complejo TRAPPI a la vesícula que media la activación de Ypt1. Entonces Ypt1-GTP recluta efectores cascada abajo entre los que se encuentra el factor amarra Uso1 que permite el acercamiento entre la vesícula y la membrana del cis-Golgi. Posteriormente una quinasa del Golgi, Hrr25, fosforila a Sec23 y esto provoca la despolimerización de la cubierta COPII permitiendo el reconocimiento entre los complejos SNAREs que mediarán la fusión de la vesícula. Las SNAREs que median este proceso en levaduras son las proteínas Sed5, Bos1, Bet1 y Sec22 en colaboración con la proteína SM

Sly1 (revisado en Barlowe & Miller, 2013). Además de Uso1, se han descrito otros factores amarra del tipo *coiled-coil* que también actúan en este evento de transporte en levaduras como es el caso de Grh1 (GRASP65 en mamíferos). En mamíferos existe toda una red de este tipo de proteínas en los distintos compartimentos a las que se denomina golginas, que median procesos de anclaje de vesículas de distinta procedencia siendo las proteínas GM130, p115 y GMAP-210 las localizadas en el ERGIC (revisado en Gillingham & Munro, 2016).

Recientemente se ha descrito un modelo alternativo en levaduras según el cual las vesículas COPII una vez formadas no serían liberadas al citosol, sino que sería el compartimento cis-Golgi el que se aproximaría a los ERES para capturar a los cargos tras la despolimerización de la cubierta en estos dominios (Kurokawa et al., 2014). Este modelo de *hug-and-kiss* aseguraría un transporte de la carga más eficiente siendo la función de COPII únicamente la de concentrar al cargo en los ERES. Este modelo cobraría fuerza en levaduras debido a la escasa distancia presente entre el RE y el cis-Golgi en este organismo.

1.3.2. Transporte retrógrado en vesículas COPI.

Una vez que las vesículas COPII se han escindido del RE, viajan hasta su fusión con el compartimento cis-Golgi. En este compartimento algunas proteínas que deben ser recicladas, como aquellas propias del RE que han escapado o los receptores de cargo, son reconocidas y devueltas de nuevo al RE en vesículas COPI. Además de estas, algunas proteínas desplegadas o mal ensambladas serán también reconocidas para su incorporación en vesículas COPI. Estas vesículas se encargan del tráfico retrógrado desde el cis-Golgi hasta el RE y en levaduras están compuestas por un complejo interno formado por las proteínas Sec26, Sec21, Ret2 y Ret3 y un complejo externo formado por Cop1/Sec33/Ret1, Sec27 y Sec28 (**Figura 2**). En este caso el reclutamiento de la cubierta requiere de la activación de la GTPasa Arf1 por los GEFs Gea1 y Gea2 en *S.cerevisiae* (revisado en Barlowe & Miller, 2013).

Las señales de reconocimiento por COPI incluyen desde los motivos HDEL presentes en algunas proteínas solubles, reconocidos en el cis-Golgi por el receptor Erd2 en levaduras, a señales dilisina o diarginina en el caso de cargos TM, reconocidas directamente por el complejo COPI. Además, también existen otros receptores que median el tráfico retrógrado como es el caso del complejo Erv41-Erv46 que hemos comentado antes y el caso de Rer1. Rer1 es una proteína altamente conservada que cicla entre el RE y el cis-Golgi mediando el reconocimiento de residuos polares localizados en los segmentos transmembrana de sus cargos, los cuales van desde proteínas propias del RE a subunidades desensambladas de complejos multiméricos (Sato et al., 2003 y 2004; revisado en Annaert & Kaether, 2020).

Además, al igual que en los restantes eventos del tráfico, estas vesículas requieren de factores amarra y SNAREs para su fusión con el RE. En el caso de las vesículas COPI este factor amarra lo constituye el complejo Dsl1 formado por las subunidades Dsl1, Tip20 y Sec39 (Dsl3 en mamíferos) en levaduras, mientras que las proteínas SNARE implicadas son Sec22, Sec20, Use1 y Ufe1 (revisado en Barlowe & Miller, 2013).

1.4. LA RUTA SECRETORA TARDÍA.

El siguiente paso de la ruta secretora lo constituye el aparato de Golgi, donde se fusionan las vesículas COPII procedentes del RE. El complejo de Golgi está compuesto por una serie de cisternas membranosas apiladas unas sobre otras. Estas cisternas se clasifican como cis (región más proximal al RE), medial y trans. Las proteínas entran por la cara cis del Golgi y progresan a través de su región medial para finalmente llegar a la región trans o TGN desde donde serán clasificadas según su compartimento celular de destino. El Golgi de *S.cerevisiae* presenta una morfología peculiar con respecto al de otros organismos al carecer de cisternas apiladas, pero conserva la funcionalidad característica de cada una de las divisiones definidas en otros organismos (Losev et al., 2006).

El modelo de maduración cisternal descrito en *S.cerevisiae* es el más aceptado hoy día para explicar cómo se produce el transporte dentro del aparato de Golgi. Este modelo está basado en los estudios de microscopía de alta resolución *in vivo* realizados en los laboratorios de Glick y Nakano a partir de 2006. En este modelo las cisternas del aparato de Golgi llevan a cabo un movimiento unidireccional formándose en la región cis, madurando con sus cargos en la región medial para finalmente constituir la región trans del Golgi. A su vez, el modelo contempla un tráfico retrógrado entre cisternas que viene dado por las vesículas COPI (revisado en Feyder et al., 2015).

El fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P) ha demostrado tener un papel de considerable importancia en el funcionamiento del complejo de Golgi y, por lo tanto, en el tráfico de proteínas a través de este compartimento. El PI4P se distribuye de acuerdo con un gradiente creciente de concentración desde las cisternas más tempranas del Golgi hasta el TGN. Este gradiente juega un papel en el reclutamiento de distintas proteínas y complejos, necesario para procesos como el avance anterógrado desde el TGN de determinadas proteínas (Santiago-Tirado & Bretscher, 2011).

A nivel del TGN se produce la distribución (“*sorting*”) de las distintas proteínas hasta su compartimento de destino, ya sea la membrana plasmática, el medio extracelular, el sistema endosomal o la vacuola. A su vez, al TGN llegan vías de transporte retrógrado que contribuyen al mantenimiento de su identidad y funcionalidad. A continuación, se comentan las vías de transporte bidireccional operando en el TGN.

1.4.1. TRANSPORTE ENTRE EL TGN Y LA MP.

Exocitosis o transporte desde el TGN a la MP.

Dentro del transporte a la MP es importante distinguir entre un transporte polarizado del cargo a regiones concretas de la MP, necesario por ejemplo en eventos como la citocinesis asimétrica por gemación o en el crecimiento durante el proceso de conjugación en *S.cerevisiae*, y un transporte no polarizado en el cual el cargo se distribuye a lo largo de la MP puesto que su función no se requiere en zonas específicas de dicho compartimento (revisado en Bi & Park, 2012). En las células animales también existen procesos que requieren

la polarización de sus componentes como es el caso de los procesos inmunológicos o de migración celular (revisado en Allam et al., 2018).

La ruta de transporte que dirige proteínas a la MP está mediada principalmente por el citoesqueleto, proteínas motoras y por transportadores tubulares en lugar de las características vesículas con cubierta. Ahora bien, existen excepciones como es el caso del complejo exómero de *S.cerevisiae* que podría ser considerado una cubierta/adaptador que media el transporte polarizado de ciertos cargos a la MP (Wang et al., 2006). En el caso de *S.cerevisiae* el transporte a la MP puede incluir a mayores un paso previo de tráfico en los endosomas mediado por el complejo adaptador AP-1 (revisado en Spang, 2015). En este organismo la formación de la vesícula desde el TGN, su tráfico y fusión con la MP requiere del reclutamiento y activación secuencial de una serie de Rab GTPasas, siendo a su vez importante el papel del gradiente de PI4P en estos procesos (Hammer & Sellers, 2011). Una vez que la proteína ha alcanzado la MP, puede llevar a cabo su función y posteriormente ser endocitada, bien para su reciclaje, o bien para su degradación definitiva en la vacuola. Ambas opciones se detallan en los siguientes puntos.

Endocitosis. La vuelta desde la MP.

Como se ha comentado en el punto previo, las proteínas TM que alcanzan la MP son posteriormente devueltas al sistema endosomal, ya sea para su reciclaje al TGN o para su degradación en la vacuola (MacDonald & Piper, 2016). La endocitosis se basa en la internalización de proteínas de la MP hacia los endosomas. Aunque se han descrito procesos de endocitosis independientes de clatrina, la más habitual y estudiada es la endocitosis mediada por clatrina o CME (Clathrin-Mediated Endocytosis).

En *S. cerevisiae* este proceso comienza con el reconocimiento del cargo por los adaptadores de la vesícula. La principal señal que marca a una proteína para ser endocitada es la ubiquitinación. En el caso de levaduras la ubiquitinación de los cargos que van a ser endocitados es mediada por Rsp5. Esta ubiquitina ligasa E3 puede o bien reconocer directamente dominios con la secuencia [L/P]PxY dentro de los cargos, o bien si el cargo no presenta esos dominios, utilizar unos adaptadores denominados arrestinas que sirven de puente entre Rsp5 y sus cargos (Mac Gurn et al., 2012). A partir de aquí la CME se puede dividir en varias fases (revisado en Goode et al., 2015; Lacy et al., 2018):

- Fase inmóvil o de formación de la cubierta: Esta fase incluye una fase de cubierta temprana que se inicia con el reclutamiento de las proteínas Ede1, Pal1, Syp1, el complejo adaptador AP-2 y la clatrina que interaccionan entre sí, con el PI(4,5)P₂ de la MP y reclutan a los efectores que constituyen la denominada fase de cubierta intermedia y tardía, los cuales permitirán finalmente la unión de los denominados Factores Promotores de la Nucleación (NPFs) de actina.
- Fase móvil: Se inicia con el reclutamiento de la actina por sus NPFs, que después de polimerizar forma una red que, junto con las miosinas, generará la fuerza motora que permitirá la invaginación de la membrana. Por último, un proceso coordinado mediado por fosfatasas, anfifisinas y endofilinas mediará la escisión final de la vesícula.

- Fase de disolución: Una vez formada la vesícula, tiene lugar una fase de despolimerización de actina y eliminación de la cubierta en la que participan distintos tipos de proteínas.

Reciclado de proteínas desde la MP.

Una vez que las proteínas TM han ejercido su función y se han endocitado, estas deben ser clasificadas de nuevo para alcanzar la vacuola o ser recicladas, proceso que ocurre en el TGN como plataforma general de clasificación proteica en la célula. En *S.cerevisiae* el reciclado puede ser temprano vía los complejos adaptadores de clatrina (AP-1 o epsinas) o más tardío desde el endosoma tardío vía un complejo denominado retrómero. Ambos, AP-1 y retrómero, serán explicados en el siguiente apartado puesto que estos adaptadores/complejos desempeñan un papel en el tráfico bidireccional entre TGN y endosomas.

1.4.2. TRÁFICO ENTRE EL TGN Y LOS ENDOSOMAS.

Aunque la organización general y las funciones principales de los distintos compartimentos del sistema de endomembranas se encuentran conservadas a escala evolutiva, existen diferencias entre cada organismo y tipo celular. Es precisamente en el tráfico entre el Golgi y la vacuola/lisosoma donde existe una mayor diversidad y especialización de compartimentos. Mientras que en mamíferos existe una enorme diversidad de endosomas con funciones específicas como es el caso de los endosomas tempranos, tardíos, de reciclaje, exosomas y lisosomas, en otros organismos esa variabilidad es mucho menor (revisado en Spang, 2015). Este es el caso de *S.cerevisiae*, donde recientemente se ha demostrado la existencia de un único compartimento celular que funcionaría como TGN y endosoma temprano a la vez (Day et al., 2018; Ver **Figura 3A**), en contra del modelo clásico donde el endosoma temprano (EE= "Early Endosome") y el TGN se presentaban como compartimentos distintos. De acuerdo con este modelo en *S.cerevisiae* existiría un único compartimento TGN/EE y un compartimento prevacuolar estable (PVC="Prevacuolar Compartment"), también denominado endosoma tardío (LE="Late Endosome") o cuerpo multivesicular (MVB="Multivesicular Body"), además de la vacuola. De esta manera cuando hablemos de TGN en *S.cerevisiae* estaremos hablando del compartimento TGN/EE, compartimento en el cual convergen tanto la ruta secretora como la endocítica (Day et al., 2018).

Es importante comentar aquí también que existe un proceso de maduración endosomal que define la identidad de estos compartimentos. Así, el LE/PVC/MVB proviene de la maduración del TGN/EE y constituye el paso previo a la vacuola. El proceso de maduración de TGN/EE hasta LE viene marcado por una serie de transiciones como son el recambio de la GTPasa Vps21/Rab5 por Ypt7/Rab7, el de PI3P por PI(3,5)P₂ y el del complejo amarra CORVET por el complejo HOPS, la generación de vesículas intraluminales y la acidificación del pH (revisado en Hierro et al., 2015; Balderhaar & Ungermann, 2013).

Complejos adaptadores del tráfico intracelular en el TGN/EE.

El transporte bidireccional entre el TGN y los endosomas depende principalmente de clatrina. Sin embargo, la clatrina es incapaz de unirse directamente a las membranas y sus cargos requiriendo para ello de una serie de adaptadores que se van a unir a la membrana y van a encargarse del reclutamiento del cargo, sirviendo además como puente para el ensamblaje de la clatrina y contribuyendo al proceso de vesiculación *in vivo* (Zaremba & Keen, 1983). Los adaptadores de clatrina más importantes para el tráfico en el TGN/EE en levaduras son el complejo AP-1, las GGAs y las epsinas. Además, entre los adaptadores del tráfico en este compartimento, y en concreto del tráfico retrógrado al TGN/EE, también incluimos al complejo denominado retrómero, aunque su unión a la clatrina no se ha demostrado y presenta características distintas en su funcionamiento a las de los adaptadores de clatrina.

Adaptadores de clatrina.

- **Complejo AP-1.**

Este complejo pertenece a la familia de las proteínas denominadas adaptinas. En *S.cerevisiae* está compuesto por las adaptinas mayores Apl4 y Apl2, una de las dos subunidades alternativas medianas Apm1 o Apm2 y la adaptina pequeña Aps1 (Boehm & Bonifacino, 2001). Se recluta al TGN donde se asocia con 2 moléculas de la GTPasa Arf1 que contribuirán al reclutamiento de más complejos AP-1 y así a la estabilización de la conformación abierta del complejo; conformación en la cual se permite la concentración del cargo y el ensamblaje de la clatrina (Canagarajah et al., 2013; Paczkowski et al., 2015). La función de este complejo en mamíferos es la de mediar la segregación de proteínas entre las regiones del TGN y endosomas tempranos. En *S.cerevisiae*, donde solo existe el compartimento único TGN/EE, este complejo estaría mediando el avance o el reciclaje intra-Golgi del cargo durante una fase tardía del proceso de maduración cisternal (**Figura 3A**). El número de cargos ligados a este complejo en *S.cerevisiae* es muy limitado (revisado en Spang, 2015).

- **GGAs (Golgi-localized, Gamma-ear containing ARF-binding proteins).**

Son adaptadores monoméricos que se identificaron en base a la similitud de su secuencia con la del dominio “ear” C-terminal de AP-1. Estos adaptadores tienen una estructura formada por tres dominios en tándem: VHS, GAT y GAE. En mamíferos el dominio VHS (Vps-27, Hrs and STAM) es necesario para el reconocimiento de los cargos a través de motivos DXXLL, mientras que en levaduras es el dominio GAT (GGA and TOM1) el que media la interacción con los cargos (Scott et al., 2004; Erpapazoglou et al., 2008). El reconocimiento del cargo en levaduras parece producirse a través de residuos de ubiquitina (lo más habitual), o bien a través de dominios ácidos o fosforilaciones presentes en este (revisado en Bonifacino, 2004; De et al., 2013). El dominio GAT está implicado a su vez en el reclutamiento a las membranas del TGN/EE al interactuar con la GTPasa Arf1 y el lípido PI4P. Entre el dominio GAT y GAE existe una región bisagra que resulta esencial para la unión a la clatrina.

Por último, el dominio GAE (γ -adaptin ear) está implicado en la interacción con otras proteínas que participan en procesos de formación y fusión de vesículas (revisado en Bonifacino, 2004; Uemura & Waguri, 2019). Existen dos GGAs en levaduras y tres en mamíferos, con arquitectura similar y probablemente funciones análogas. La delección conjunta de *GGA1* y *GGA2* en levaduras afecta al transporte desde el TGN/EE al compartimento prevacuolar de un diverso rango de proteínas (**Figura 3A**).

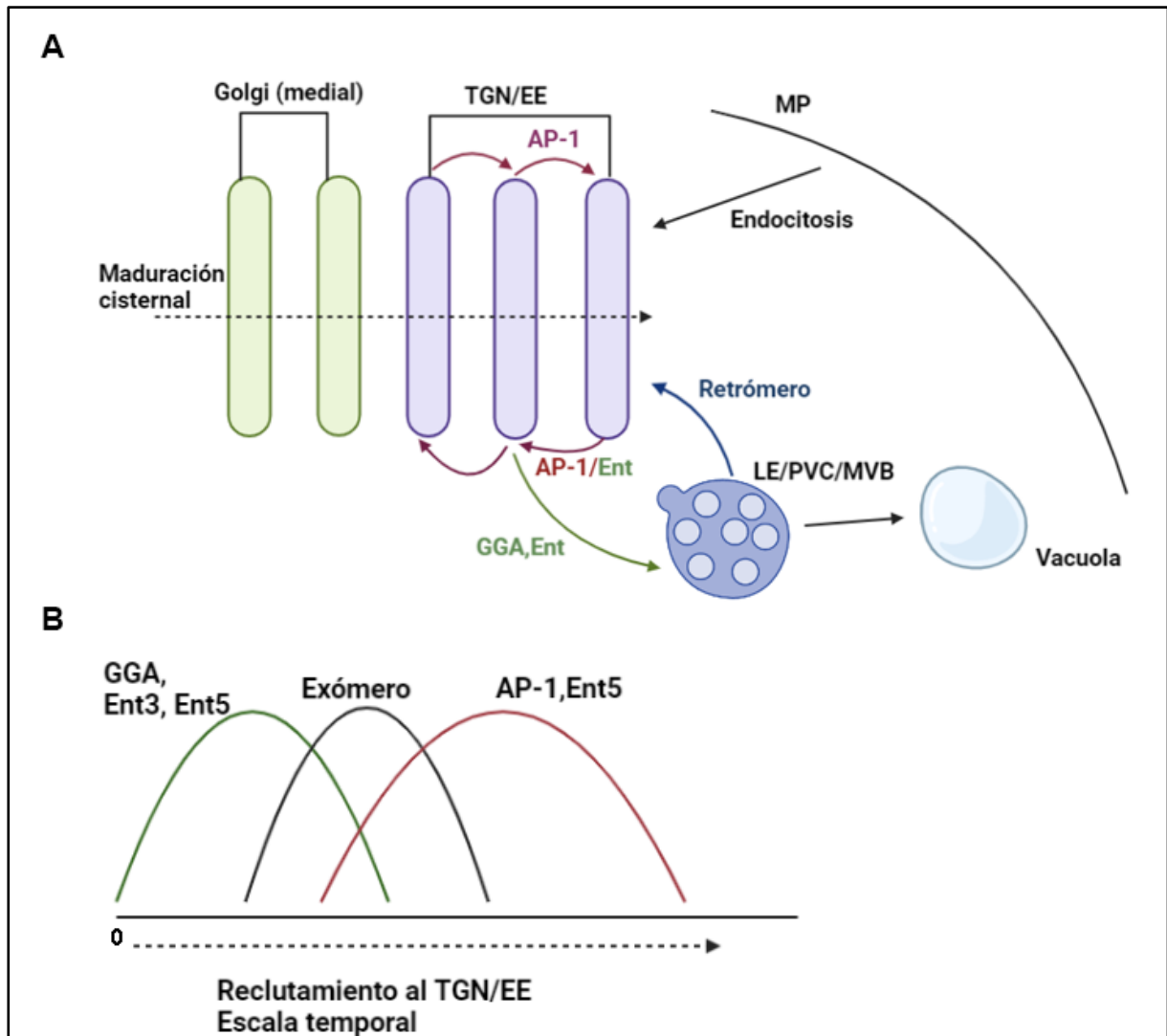


Figura 3. A) Vías bidireccionales de tráfico y adaptadores/cubiertas implicados en el tráfico en el TGN/EE en *S.cerevisiae*. Nótese como en el TGN/EE de *S.cerevisiae* convergen tanto la ruta secretora como la endocítica. B) Orden temporal de reclutamiento de adaptadores al TGN/EE.

- **Proteínas de tipo Epsina: Ent3 y Ent5.**

Estas proteínas se identificaron en un *screening* de doble híbrido que tenía como objetivo identificar proteínas de interacción con AP-1 y GGAs (Duncan & Payne, 2003). En levaduras las epsinas Ent3 y 5 están implicadas en la maduración de vesículas de clatrina en la región del TGN/EE donde reclutan cargos y asisten a los adaptadores AP-1 y GGAs. El doble mutante presenta defectos en el tráfico de SNAREs, carboxipeptidasas vacuolares,

cargos ubiquitinados de la ruta del MVB y cargos específicos como es el caso de la quitín sintasa Chs3. Ent3 y Ent5 presentan diferencias en sus dominios ENTH (Epsin N-terminal Homology), lo que hace que cada una presente ciertas funciones específicas (De Craene et al., 2012). En concreto, Ent3 asiste principalmente en el transporte mediado por Gga2 del TGN/EE al PVC de las SNAREs Vti1, Pep12 y Syn8 (Chidambaram et al., 2008), mientras que Ent5 parece tener un papel en la maduración de la vesícula, interaccionando con Gga2, AP-1 y la clatrina. Ent5 muestra interacción con Chs3, pero no con las SNAREs (Hung & Duncan, 2016; revisado en Morvan et al., 2015). Ambas, sin embargo, parecen funcionar en el tráfico retrógrado dentro del TGN/EE de Yck2 y Snc1 (Zimmermann et al., 2010) y en la retención de Chs3 en el TGN/EE (Copic et al., 2007) (**Figura 3A**).

El reclutamiento de todos estos adaptadores de clatrina al TGN/EE se da de forma coordinada de acuerdo con dos olas de reclutamiento reguladas por los niveles de PI4P (Daboussi et al., 2012). La primera ola implica el reclutamiento de Gga2, Ent3 y una parte minoritaria de Ent5 y en la segunda ola se reclutan AP-1 y la mayoría de Ent5 (**Figura 3B**). Cabe destacar que recientemente se ha implicado también al complejo exómero como regulador del reclutamiento de estos adaptadores de clatrina a nivel del TGN/EE, produciéndose su llegada al TGN/EE después de la de las GGAs, pero antes que la de AP-1 (Anton-Plagaro et al., 2021; **Figura 3B**).

El retrómero. Un complejo implicado en el tráfico retrógrado.

El retrómero es un complejo proteico que media el transporte retrógrado desde los endosomas tardíos al TGN/EE (**Figura 3A**) y que se encuentra conservado en todos los organismos eucariotas. Su función se describió por primera vez en levaduras, donde media el transporte retrógrado del receptor vacuolar Vps10 (Seaman, 2005). El retrómero se puede diseccionar en dos subcomplejos: uno formado por las proteínas Vps35, Vps29 y Vps26, que es el responsable del reconocimiento del cargo, y otro compuesto por el dímero Vps5-Vps17 con un papel estructural. La GTPasa Ypt7, así como la proteína Snx3 son las responsables del reclutamiento del trímero de reconocimiento sobre los endosomas (Seaman, 2012; Liu et al., 2012). La localización de estas proteínas en *S.cerevisiae* llevó a delimitar la acción del retrómero a nivel de los endosomas tardíos (Seaman, 2012). El reclutamiento de los subcomplejos ocurre de manera concomitante a la selección del cargo y simultáneamente el dímero Vps5-Vps17 se ensambla promoviendo la formación de estructuras tubulares de membrana endosomal en las que se incluyen los cargos.

Hasta el momento no está clara la participación de la clatrina en el funcionamiento del retrómero ni tampoco se ha demostrado la interacción de la clatrina con alguno de sus componentes. De acuerdo con los estudios realizados hasta el momento, hay 2 teorías: una es que el retrómero recupere proteínas desde los endosomas tardíos, mientras que la clatrina sea la responsable del reciclaje desde los endosomas tempranos y la otra es que ambas maquinarias puedan actuar en tándem reclutándose inicialmente la clatrina (por AP-1) y posteriormente el retrómero.

Además del retrómero, existen unas proteínas denominadas nexinas (SNX=" Sorting Nexin") que también participan en vías de transporte retrógrado. En levaduras existen 11.

Algunas como la nexina Snx3 funcionan con el retrómero reciclando proteínas desde el PVC, mientras que otras forman complejos independientes del retrómero (complejos Snx4-Snx41 y Snx4-Snx42) que parecen participar en el reciclado en el TGN/EE y en procesos de autofagia selectiva (Ma et al., 2017; revisado en Hanley & Cooper, 2020).

1.4.3. Vías de transporte a la vacuola.

El último paso en la vida de una proteína de membrana es su degradación en la vacuola para su reciclado molecular. Las proteínas TM que provienen de la ruta endocítica son transportadas desde el TGN/EE al PVC, donde estas son reconocidas e internalizadas en lo que se conoce como la ruta del cuerpo multivesicular o MVB que culmina con su degradación en la vacuola. Además de esta, existen otras rutas de transporte de proteínas desde el TGN a la vacuola. Una de ellas, la denominada ruta CPY, converge con la ruta endocítica a nivel del PVC ya que también internaliza sus cargos vía la ruta del MVB. Adicionalmente, existen una vía de transporte directo a la vacuola mediada por el complejo AP-3 y la bien conocida ruta autofágica. Estas 2 últimas rutas no requieren de la ruta del MVB, sino que en ellas las vesículas con los correspondientes cargos se fusionan directamente con la vacuola.

Ruta endocítica a la vacuola o ruta del cuerpo multivesicular.

Una vez endocitadas, las proteínas TM que no van a reciclarse siguen el camino hasta la vacuola para su degradación. En levaduras el marcaje de la proteína con ubiquitina en la MP constituye la señal típica que marca su camino a la degradación vacuolar en lo que se conoce como la ruta del cuerpo multivesicular o MVB. El MVB (Prescianotto-Baschong & Riezman, 1998) es el resultado de la invaginación de la membrana del endosoma para englobar a las proteínas TM en unas vesículas conocidas como vesículas intraluminales (ILVs="Intra-luminal vesicles"). Una vez incorporados los cargos en las ILVs, el MVB/PVC se fusiona con la vacuola liberando su contenido, que será degradado por las proteasas vacuolares (McDermott & Kim, 2015; Mageswaran et al., 2014).

Para que tenga lugar el proceso de reconocimiento de los cargos y formación de las ILVs se requiere de una maquinaria compleja que denominamos como el complejo ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). La maquinaria del ESCRT incluye 5 subcomplejos de proteínas denominados ESCRT-0, I, II, III y el complejo Vps4 (**Figura 4**). El complejo ESCRT-0 actúa cascada arriba del ESCRT-I, el cual luego activa al ESCRT-II y este a su vez recluta al ESCRT-III y al complejo Vps4. Aunque la principal señal para el reconocimiento por el ESCRT es la ubiquitinación del cargo, se han descrito algunos casos en los cuales el cargo no tiene que estar ubiquitinado para ser reconocido por el ESCRT, de manera que parece que en estos casos bastaría la interacción del cargo con alguno de los subcomplejos del ESCRT (Mageswaran et al., 2014; Shields & Piper, 2011).

Tanto el ESCRT-0 como el ESCRT-I y ESCRT-II presentan sitios de unión a ubiquitina por lo que se consideran los complejos encargados del reconocimiento del cargo, mientras que el ESCRT-III tiene la capacidad de deformar las membranas permitiendo por lo tanto la formación definitiva de las ILVs. El desensamblaje del ESCRT-III gracias a la energía que

proporciona la ATPasa Vps4, así como la desubiquitinación dependiente de Doa4 permiten al cargo difundir hacia el interior en las ILVs, mientras que los componentes del ESCRT se liberan al citoplasma (Mageswaran et al., 2014) (**Figura 4**). La ausencia de cualquiera de los componentes de esta maquinaria conduce a la formación del llamado “compartimento de clase E” o endosoma E, una estructura vesicular anormalmente agrandada, adyacente a la vacuola y formada por el colapso de los endosomas (Piper et al., 1995).

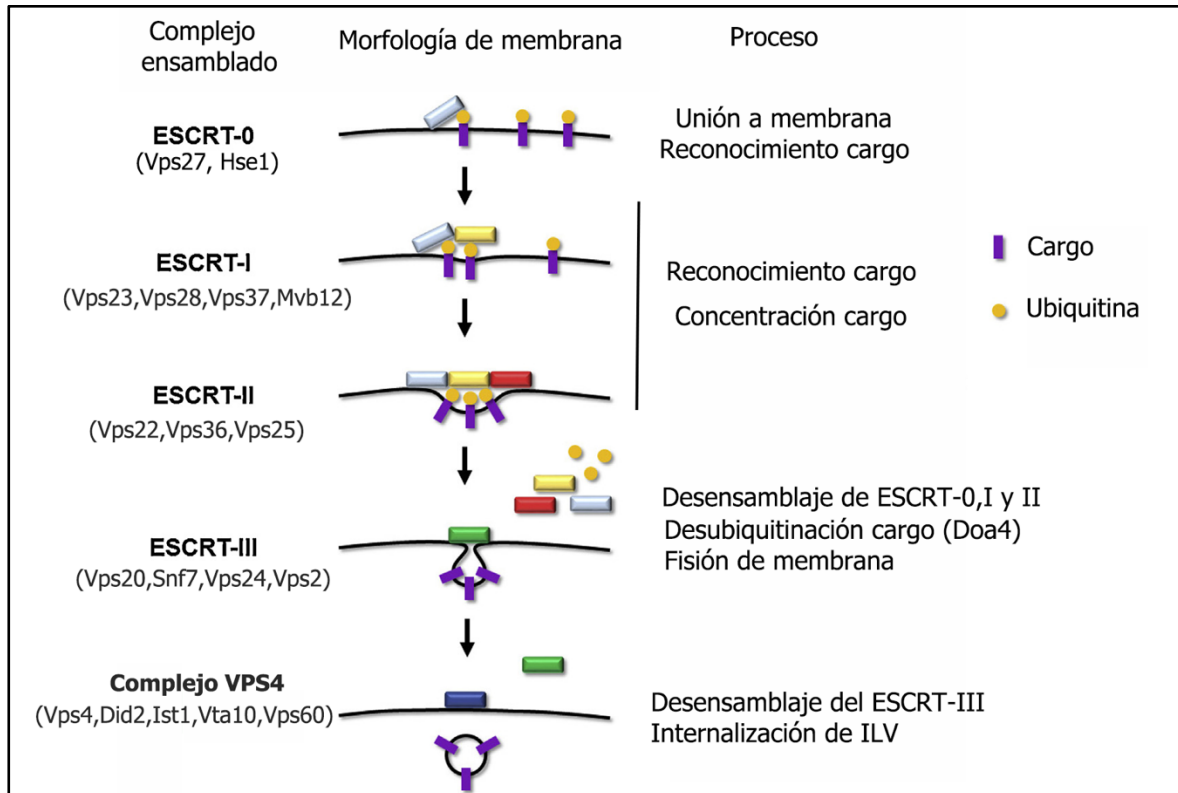


Figura 4. Vía del cuerpo multivesicular mediada por el ESCRT en levaduras. Adaptado de (McDermott & Kim, 2015).

Gracias a la capacidad de invaginación de membranas del ESCRT, este se ha asociado a muchos otros procesos celulares como es el caso del cierre del autofagosoma o la reparación de membranas lisosomales (revisado en Vietri et al., 2020).

Ruta CPY.

Es una ruta que dirige proteínas desde el TGN/EE a la vacuola usando los endosomas como compartimento intermediario. Su nombre proviene del primer cargo que se describió que seguía esta ruta, la carboxipeptidasa Y (CPY). La CPY es captada a nivel del TGN por su receptor, Vps10. A continuación, este complejo CPY-Vps10 es reconocido por los GGAs siendo transportado en vesículas recubiertas por clatrina hasta el PVC donde Vps10 se disocia de su cargo y la CPY es introducida en la vacuola por la ruta del MVB convergiendo a este nivel con los cargos procedentes de la ruta endocítica (Conibear & Stevens, 1998).

Ruta AP-3 o ALP.

Esta ruta es mediada por el complejo adaptador AP-3 el cual no se une a clatrina y lleva a cabo el transporte del cargo de forma directa en vesículas desde el TGN/EE a la vacuola en levaduras. Además de la fosfatasa alcalina (ALP) a la que la ruta debe su nombre (Cowles et al., 1997), siguen esta ruta otras proteínas como Yck3, Vam3 y Ncr1 (Anand et al., 2009). Todas estas proteínas se localizan en la membrana de la vacuola, lo que sugiere que la ruta AP-3 funciona para dirigir proteínas de manera directa y selectiva hacia la membrana de la vacuola.

Autofagia.

La autofagia es una vía de tráfico a la vacuola que dirige constituyentes celulares a este compartimento para su degradación. Aunque puede darse en condiciones basales, la autofagia se induce normalmente ante situaciones de estrés. Podemos distinguir dentro de esta entre macroautofagia y microautofagia (revisado en Nakatogawa, 2020; Schuck, 2020). La macroautofagia implica la formación del denominado autofagosoma, vesícula de doble membrana que se asocia a la zona donde se va a producir el secuestro del cargo, ya sea este un agregado, un orgánulo u otro tipo de componente celular. Una vez formado el autofagosoma, este se fusiona con la vacuola/lisosoma. Esta vía requiere de las denominadas proteínas ATG (*Autophagy related Genes*) que contribuyen a la formación del autofagosoma, así como de toda una serie de maquinaria del tráfico vesicular que participa tanto en la vía secretora temprana como en la tardía. La microautofagia, sin embargo, por lo general no requiere del núcleo de proteínas ATG puesto que no conlleva la formación del autofagosoma. Esta vía se induce generalmente ante algún tipo de estrés y en ella tiene lugar la invaginación directa por la vacuola/lisosoma del correspondiente componente celular.

A su vez, se puede distinguir entre una autofagia no selectiva y una selectiva. En la no selectiva no hay un reconocimiento específico de ningún tipo de cargo o componente celular, mientras que en la autofagia selectiva hay un reconocimiento de algún tipo de orgánulo o componente específico, reconocimiento que además suele darse a través de un receptor.

2. MECANISMOS DE CONTROL DE CALIDAD A LO LARGO DE LA VÍA SECRETORA.

El tráfico a lo largo de la vía secretora es complejo, además de susceptible a múltiples problemas que podrían conducir en último término a su bloqueo y el eventual colapso celular. Por lo tanto, a lo largo del mismo existen múltiples mecanismos de control de calidad o QC (Quality Control), destinados a asegurar el mantenimiento de la homeostasis de proteínas (proteostasis) dentro de la célula. Podemos diferenciar así distintos mecanismos en función del orgánulo en el que operan: ERQC (ER Quality Control), GQC (Golgi Quality Control) y PMQC (Plasma Membrane Quality Control) (revisado en Sun & Brodsky, 2019).

2.1. CONTROL DE CALIDAD EN EL RE (ERQC).

El RE constituye probablemente el compartimento más importante para el control de calidad puesto que es aquí a donde acceden las proteínas a la vía secretora. Además, en este compartimento se produce el plegamiento de las proteínas, proceso esencial para que estas adquieran su función. Este plegamiento tiene que ser estrechamente controlado para prevenir el desplegamiento y/o la formación de agregados que puedan colapsar el tráfico intracelular y conducir a enfermedades de diverso tipo como es el caso del cáncer y de ciertas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson (Guerreiro & Brodsky, 2012; Labbadia & Morimoto, 2015).

Por todo lo anterior no es sorprendente encontrar en la célula eucariota toda una serie de procesos/sistemas que conforman el denominado control de calidad del RE o ERQC; que se van a encargar de que las proteínas desplegadas, mal ensambladas o agregadas sean replegadas, retenidas o eliminadas, previniendo así su toxicidad celular (**Figura 5**). Estos sistemas por orden de actuación ante el desplegamiento, desensamblaje y/o agregación son:

1. Sistema encargado de la facilitación del plegamiento: Este sistema está conformado por un conjunto de proteínas denominadas chaperonas y otras enzimas de plegamiento. En primera instancia, cuando una proteína se encuentra desplegada este sistema de chaperonas y enzimas la reconoce y contribuye a su plegamiento. Una vez que el ciclo de plegamiento se ha completado, si la proteína se ha plegado correctamente entonces la maquinaria conformada por dichas chaperonas y enzimas de plegamiento la dirige a los sistemas de salida del RE, mientras que si se encuentra terminalmente desplegada entonces media su retención en este compartimento.
2. Sistema encargado de la eliminación de proteínas desplegadas, subunidades desensambladas o agregados tóxicos: Una vez que una proteína se encuentra terminalmente desplegada, mal ensamblada o agregada y, por consiguiente, se encuentra retenida por el sistema de chaperonas, la célula trata de eliminarla para paliar su toxicidad. Los sistemas de degradación de proteínas desplegadas, desensambladas o agregadas del RE incluyen la denominada ruta UPS (Ubiquitin Proteasome System) y la reticulofagia (revisado en Mehrdash & Hochstrasser, 2019; Chino & Mizushima, 2020). La ruta UPS, que dirige dichos sustratos a la degradación por el proteasoma, incluye al sistema ERAD (Endoplasmic Reticulum-associated Degradation) y al más recientemente descrito sistema INMAD (Inner Nuclear

Membrane-Associated Degradation). Estos constituyen la primera línea de defensa ante el desplegamiento de proteínas, llevando a cabo el reconocimiento y direccionamiento de proteínas desplegadas al citosol (ERAD)/ núcleo (INMAD) para la degradación por el proteasoma 26S. El otro gran sistema de degradación en el RE es la reticulofagia. Este sistema se caracteriza por llevar a cabo la degradación en la vacuola/lisosoma de fragmentos del RE (autofagia selectiva). A su vez, estos fragmentos del RE pueden contener proteínas desplegadas o agregados. Aparte de degradar este tipo de proteínas, tanto la ruta UPS como la reticulofagia contribuyen a la degradación de proteínas correctamente plegadas, pero que se encuentran deslocalizadas o cuyos niveles han de ser regulados (papel regulador).

3. Sistema encargado de la agregación de proteínas desplegadas en los denominados compartimentos de control de calidad: En algunos casos la célula, en lugar de degradar a la correspondiente proteína desplegada, lo que hace es contribuir a su agregación en compartimentos de QC en los que su acumulación resulta beneficiosa en vez de perjudicial. Estos compartimentos pueden encontrarse en distintas localizaciones celulares y su formación está mediada por la acción de distintos factores proteicos y chaperonas (revisado en Sontag et al., 2017). En algunos casos los agregados simplemente se encuentran retenidos en el RE sin generar ningún tipo de toxicidad ni ser necesaria su acumulación en dichos compartimentos.

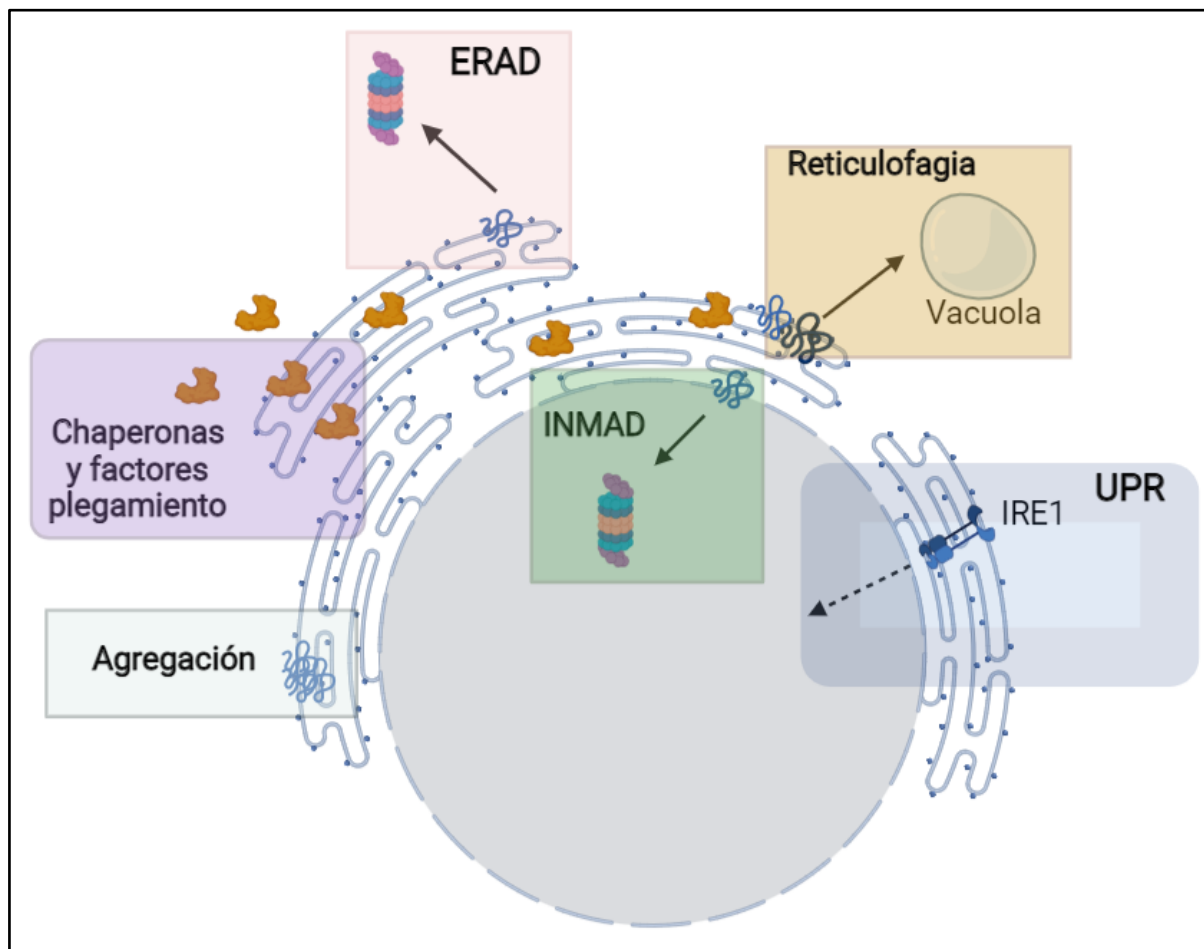


Figura 5. Sistemas/Mecanismos de control de calidad que colaboran en el ERQC de levaduras.

Si los sistemas que conforman el ERQC se saturan, se puede generar un estrés en el RE. Para lidiar con esta situación la célula cuenta con un mecanismo adicional de salvaguarda, la denominada UPR (Unfolded Protein Response). La UPR es una respuesta transcripcional que se da en condiciones de estrés como es el caso en el cual la alta concentración de proteínas desplegadas sobrecarga a los sistemas de degradación del RE (revisado en Mori, 2015). Esta respuesta, mediada por la quinasa Ire1 en levaduras, una vez activada conduce a la inducción de genes de factores de QC como las chaperonas o ciertos componentes de ERAD y reticulofagia, lo que contribuye a contrarrestar este estrés, que en caso de no controlarse podría conducir de forma eventual a la muerte celular.

A continuación, se describen en primer lugar las señales que conducen al reconocimiento por las maquinarias de estos sistemas que conforman el ERQC para después explicar los sistemas más importantes para el desarrollo de este trabajo.

2.2. SEÑALES IMPLICADAS EN EL ERQC.

Las proteínas desplegadas, desensambladas o agregadas exponen una serie de señales asociadas a su secuencia que contribuyen a su reconocimiento por los sistemas de QC y de esta manera a su exclusión del acceso a la maquinaria de salida del RE mientras estas permanezcan en dicho estado.

Entre dichas señales de desplegamiento se encuentran parches hidrofóbicos, residuos hidrofílicos dentro de segmentos transmembrana, o bien defectos de procesamiento de glicanos en el caso de glicoproteínas desplegadas (Hebert & Molinari, 2008), señales que por sus características son fácilmente reconocidas por las chaperonas y enzimas de plegamiento. En el caso de los agregados, además su formación puede enmascarar señales necesarias para la salida del RE o su tamaño puede ser demasiado grande para la entrada en vesículas COPII que tienen un diámetro de unos 70-80 nm en levaduras. Adicionalmente, subunidades desensambladas pueden exponer señales de desplegamiento del mismo tipo que las de cualquier proteína desplegada y que estarían quedando ocultas cuando forman el correspondiente complejo. Por lo tanto, todas estas señales de desplegamiento o enmascaramiento de señales de salida facilitan la unión de chaperonas u otros factores que van a mediar la retención y exclusión de los ERES de estas proteínas.

De la misma manera, determinadas modificaciones postraduccionales resultan claves para el proceso de plegamiento. La formación de puentes disulfuro llevada a cabo por las PDIs (Protein Disulfide Isomerases), así como la isomerización cis-trans de los puentes peptídicos por las PPIs (prolil cis-trans isomerasas) constituyen pasos críticos en los procesos de plegamiento de proteínas (Hebert & Molinari, 2008). Otra modificación esencial es la N-glicosilación (en el caso de proteínas glicosiladas) que necesita producirse de forma adecuada para dar lugar a una proteína con una conformación competente para el exporte, de manera que fallos en este proceso conducen a la degradación por el sistema ERAD (Vembar & Brodsky, 2008). En esta modificación ahondaremos en el capítulo de ERAD debido a su importancia en el campo y para este trabajo.

Por otra parte, y aunque mucho menos estudiadas, modificaciones con determinados lípidos han demostrado tener también un papel sobre el ERQC. La unión del glicolípido GPI a ciertas proteínas es necesaria para su salida del RE (revisado en Lopez et al., 2019).

Igualmente, se ha descrito que la palmitoilación en residuos de cisteína de ciertos sustratos como Lrp6 o Chs3 por determinadas palmitoiltransferasas (PATs) constituye un requerimiento para su transporte del RE al Golgi (Abrami et al., 2008; Lam et al., 2006). El mecanismo por el cual estas señales contribuyen al plegamiento no está claro, pero podría estar relacionado con la asociación a determinadas regiones de la membrana gracias al anclaje lipídico proporcionado por este tipo de modificaciones.

La oligomerización de proteínas también constituye una señal o proceso que favorece la salida del RE existiendo la hipótesis de que la oligomerización conduce a una curvatura de membrana local que promueve la formación de vesículas (Springer et al., 2014). Entre las proteínas que precisan de la oligomerización para su exporte del RE se encuentran Emp47 en levaduras (Sato & Nakano, 2003) y la proteína LMAN1 en mamíferos (Zheng et al., 2010).

2.3. EL SISTEMA ENCARGADO DE FACILITAR EL PLEGAMIENTO: CHAPERONAS Y OTROS FACTORES DE PLEGAMIENTO.

El control de calidad de proteínas o PQC (Protein Quality Control) es vital para mantener la proteostasis bajo condiciones normales y de estrés. En estas condiciones, las denominadas chaperonas moleculares y otras enzimas de plegamiento ayudan a plegar las proteínas y prevenir su agregación. En el RE de *S.cerevisiae* encontramos cuatro grupos principales de chaperonas moleculares y enzimas de plegamiento: la familia de chaperonas HSPs (Heat shock proteins), la cual incluye a Kar2 (Hsp70, BiP en mamíferos) y sus reguladores (Hsp40s y NEFs=Nucleotide-exchange factors); las lectinas, dentro de las cuales encontramos la proteína Cne1 en *S.cerevisiae* (homólogo a calnexina y calreticulina de mamíferos); las tiol oxidorreductasas de la familia de la PDI y las prolil cis-trans isomerasas o PPIs (Verghese et al., 2012).

De las anteriores, los sistemas de chaperonas Hsp70-Hsp40 destacan por su papel general en el plegamiento de todo tipo de proteínas. Las Hsp70s poseen dos dominios: un dominio N-terminal ATPasa y un dominio de unión al sustrato por el cual se unen a los motivos hidrofóbicos que quedan expuestos en las proteínas desplegadas y/o mal ensambladas. La hidrólisis del ATP es necesaria para su funcionamiento y esta actividad es estimulada por los cofactores Hsp40 dentro de los cuales se incluyen las chaperonas del RE Scj1, Jem1 y Sec63 en levaduras. El ciclo de plegamiento se inicia cuando las Hsp40s promueven la hidrólisis del ATP unido a las Hsp70s de manera que estas una vez unidas a ADP pasan a una conformación de alta afinidad por el sustrato al que se unen previniendo su agregación. Para que la Hsp70 vuelva a una conformación de baja afinidad y así la proteína se libere de la chaperona existen una serie de NEFs que mediarán el intercambio de ADP por ATP (**Figura 6**). Se sabe también que tanto Kar2 como ciertas Hsp40s contribuyen a mantener la solubilidad de ciertos sustratos de ERAD (revisado en Vembar & Brodsky, 2008; Hebert & Molinari, 2008).

Algunas proteínas precisan a mayores de la acción de chaperonas específicas para completar su plegamiento. Este el caso, por ejemplo, de las permeasas de aminoácidos o de la quitín sintasa Chs3 las cuales requieren de las chaperonas Shr3 y Chs7 respectivamente (Kota & Ljungdahl, 2005).

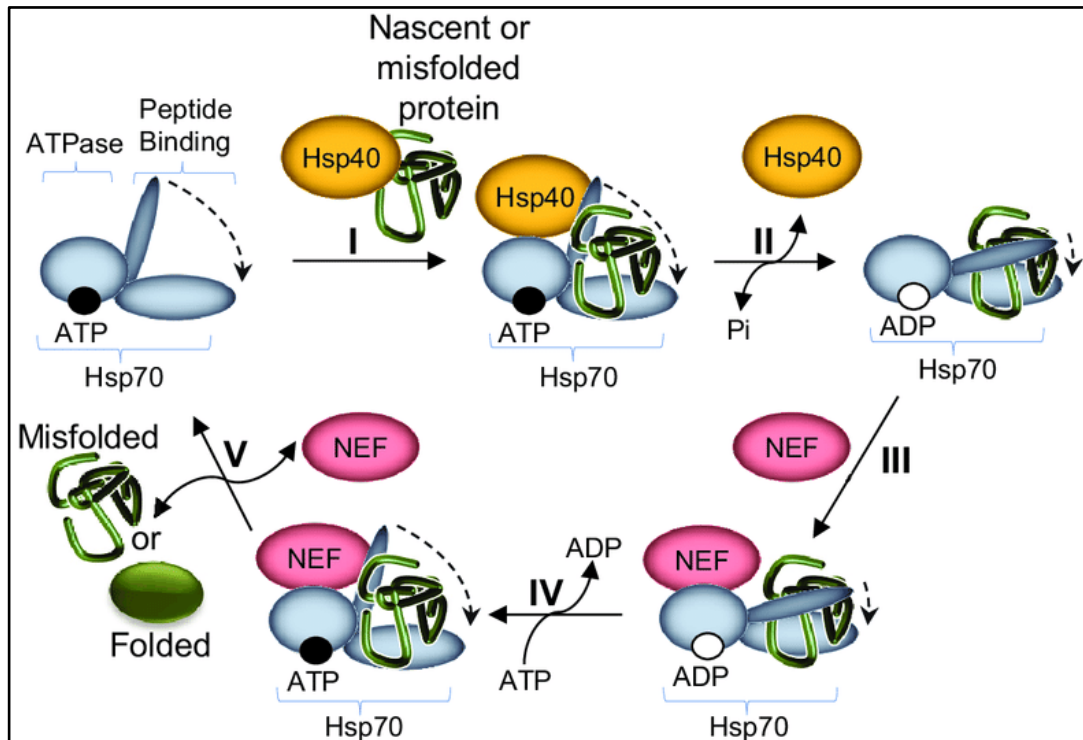


Figura 6. Ciclo de plegamiento llevado a cabo por el sistema de chaperonas Hsp70-Hsp40. De (Chaari, 2019).

En este apartado se han comentado esencialmente las chaperonas presentes en el RE de la levadura, sin embargo, existen otras chaperonas citoplásmicas que participan en el ERQC. Este es el caso por ejemplo de la chaperona Ssa1 de levaduras (familia Hsp70) que junto a sus cochaperonas Hsp40, Ydj1 o Sis1, pueden contribuir al mantenimiento de la solubilización de ciertos sustratos de ERAD, o de la chaperona Hsp104 que tiene la capacidad única en eucariotas de reconocer proteínas desplegadas que se encuentran dentro de agregados contribuyendo activamente a su liberación de estos para permitir su entrada a vías de repliegamiento (Verghese et al., 2012).

2.4. SISTEMAS DE ELIMINACIÓN DE PROTEÍNAS DESPLEGADAS DEL RE.

Los sistemas de eliminación de proteínas desplegadas que forman parte del ERQC son esenciales para mantener el adecuado fitness celular permitiendo la eliminación de especies tóxicas, que de otra forma se acumularían en el RE. Dentro de estos sistemas distinguimos entre la ruta UPS que dirige a estas proteínas a la degradación por el proteasoma y la reticulofagia que conlleva la degradación de sus sustratos en la vacuola. Es importante resaltar que estas vías de degradación y por lo tanto de control no solo contribuyen a la degradación de proteínas desplegadas y/o agregadas, sino también a la de proteínas deslocalizadas, de subunidades de complejos que no se han ensamblado o de proteínas cuyos niveles deben ser estrechamente regulados en respuesta a determinadas demandas celulares.

A continuación, se detallan estos sistemas de degradación: la ruta UPS conformada por los sistemas de ERAD e INMAD y la reticulofagia.

2.4.1. ERAD.

Dentro de la ruta UPS podemos hablar de dos sistemas de degradación, el sistema ERAD que cuenta con maquinaria presente en el RE y cuyo objetivo final es la degradación del sustrato en el proteasoma citosólico y el sistema INMAD cuya maquinaria se encuentra en la membrana nuclear interna (MNI) conduciendo a la degradación de sus sustratos en el proteasoma nuclear. Las bases del funcionamiento de ambos sistemas son las mismas, diferenciándose únicamente en ciertos componentes y la localización en la cual tienen lugar los distintos procesos que conducen a la degradación de la proteína.

Tanto los componentes como los procesos que conforman el sistema ERAD se encuentran bastante conservados en eucariotas. El proceso de ERAD incluye una serie de etapas. En primer lugar, las proteínas desplegadas son reconocidas por chaperonas u otros factores, luego son retrotranslocadas al citosol, ubiquitinadas y, por último, dirigidas para su degradación al proteasoma citosólico 26S (Vembar & Brodsky, 2008).

El control de calidad reconoce determinantes estructurales. Dependiendo de la localización de la señal de desplegamiento o degradación (degrón) en la proteína, podemos clasificar a estas como sustratos de distintos tipos o vías de ERAD (Carvalho et al., 2006):

- ERAD-C: Esta vía se da cuando la señal de desplegamiento está localizada en una zona de la proteína expuesta al citosol.
- ERAD-L: Esta vía se da cuando la señal de desplegamiento se encuentra localizada en una zona de la proteína expuesta al lumen del RE.
- ERAD-M: Esta vía se da cuando el degrón se localiza en una zona transmembrana de la proteína. En este caso los sustratos son solo proteínas transmembrana, mientras que en los otros tipos de ERAD los sustratos pueden ser tanto proteínas transmembrana como solubles.

Una vez que estos degrones se han reconocido por distintos factores, las proteínas terminalmente desplegadas sustrato de ERAD sufren un proceso de ubiquitinación en una cascada enzimática iniciada por una enzima activadora de ubiquitina o E1, a la que le sigue la acción de una enzima conjugadora de ubiquitina o E2 y la de una enzima ubiquitina ligasa (o ubiquitín ligasa) o E3 que en último término va a dar lugar a un enlace peptídico proteína-ubiquitina, usualmente a través un residuo de lisina. Las proteínas marcadas para la degradación en el proteasoma contienen normalmente al menos una cadena de poliubiquitina o múltiples monoubiquitinaciones. Las cadenas de ubiquitina típicas de ERAD son las unidas vía K48. En la levadura de gemación solo existe una enzima E1, Uba1, proteína esencial bien caracterizada. En cuanto a las E2s hay hasta 11 enzimas diferentes y existen en torno a entre 60 y 100 E3s distintas (Finley et al., 2012; revisado en Mehrtash & Hochstrasser, 2019).

En *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito 2 complejos multiproteicos localizados en la membrana del RE (revisado en Zattas & Hochstrasser, 2015; Berner et al., 2018) que participan en ERAD y se forman cada uno alrededor de una E3, la cual se caracteriza por ser una proteína politópica y poseer un dominio citosólico catalítico del tipo RING (Really Interesting New Gene):

Complejo HRD1 (HRD1 y gp78 en mamíferos) (Figura 7A): Constituido por Hrd1 (E3) y otras proteínas transmembrana del RE entre las que se incluyen su cofactor Hrd3 y las proteínas transmembrana Usa1 y Der1 (ERAD-L) / Dfm1 (ERAD-M). Lleva a cabo ERAD-L y ERAD-M. En el caso de ERAD-L se pueden incluir también otros factores luminales como es el caso de la lectina Yos9 y la chaperona Kar2 las cuales contribuyen al reconocimiento y presentación del sustrato a través de su interacción con Hrd3. La principal E2 que funciona con este complejo es la proteína citoplásmica Ubc7 que se recluta al RE vía interacción con la proteína transmembrana Cue1 asociada al complejo.

Complejo DOA10 (MARCH6/TEB-4 en mamíferos) (Figura 7B): Este complejo está básicamente constituido por la E3 Doa10 la cual se localiza tanto en la membrana del RE llevando a cabo ERAD como en la membrana nuclear interna donde se considera una de las E3s implicadas en INMAD. Lleva a cabo ERAD-C principalmente, aunque también se ha descrito su participación en ERAD-M de ciertos sustratos como Sbh2 (Habeck et al., 2015). De esta manera el complejo Doa10 esencialmente puede llevar a cabo la degradación tanto de proteínas desplegadas solubles (citosólicas o nucleares) y transmembrana que exponen su señal desplegada hacia el citosol o el nucleoplasma. Doa10 trabaja con dos E2s para la mayoría de los sustratos, Ubc6 y Ubc7, que se piensa que actúan secuencialmente llevando a cabo Ubc6 una reacción inicial de “*priming*” que iría seguida de la extensión de la cadena de ubiquitina por Ubc7 (Weber et al., 2016).

También pueden contribuir a ERAD otras E3s como es el caso de la E3 citosólica/nuclear Ubr1 que, aunque participa esencialmente en el QC de proteínas citosólicas, también puede ubiquitinar sustratos de ERAD-C trabajando con la E2 Ubc2 (Stolz et al., 2013). De la misma manera, el complejo de INMAD Asi, localizado en la membrana nuclear interna y formado por Asi1, Asi2 y Asi3, puede participar en ERAD-M de ciertos sustratos (Khmelinski et al., 2014; Foresti et al., 2014) en colaboración con las E2s Ubc7, Ubc4 y Ubc6.

El reconocimiento de sustratos de ERAD-M parece que podría hacerse de forma directa por interacción entre el degrón transmembrana y los dominios transmembrana de la E3 ubiquitina ligasa implicada en su posterior ubiquitinación, o bien de forma indirecta a través de un adaptador que forma parte de ese complejo E3. En el caso de los sustratos de ERAD-L hay una serie de chaperonas y factores luminales que se encargan de presentar el sustrato al complejo y que varían en función de si la proteína está glicosilada o no. Debido a la importancia de la N-glicosilación como mecanismo de QC, el mecanismo de ERAD-L para glicoproteínas y no glicoproteínas se detallará en el siguiente apartado. Por último, los degrones citosólicos de ciertos sustratos de ERAD-C son reconocidos inicialmente por el sistema de chaperonas Hsp70-Hsp40 Ssa1-Ydj1/Sis1, mientras que otros parecen ser reconocidos directamente por Doa10 (revisado en Mehrtash & Hochstrasser, 2019).

Aunque lo habitual es que una proteína desplegada sea dirigida a ERAD por un determinado complejo E3, hay casos en los que se ha descrito un papel de distintas E3s sobre un mismo sustrato ya que pueden existir varios degrones en una misma proteína desplegada.

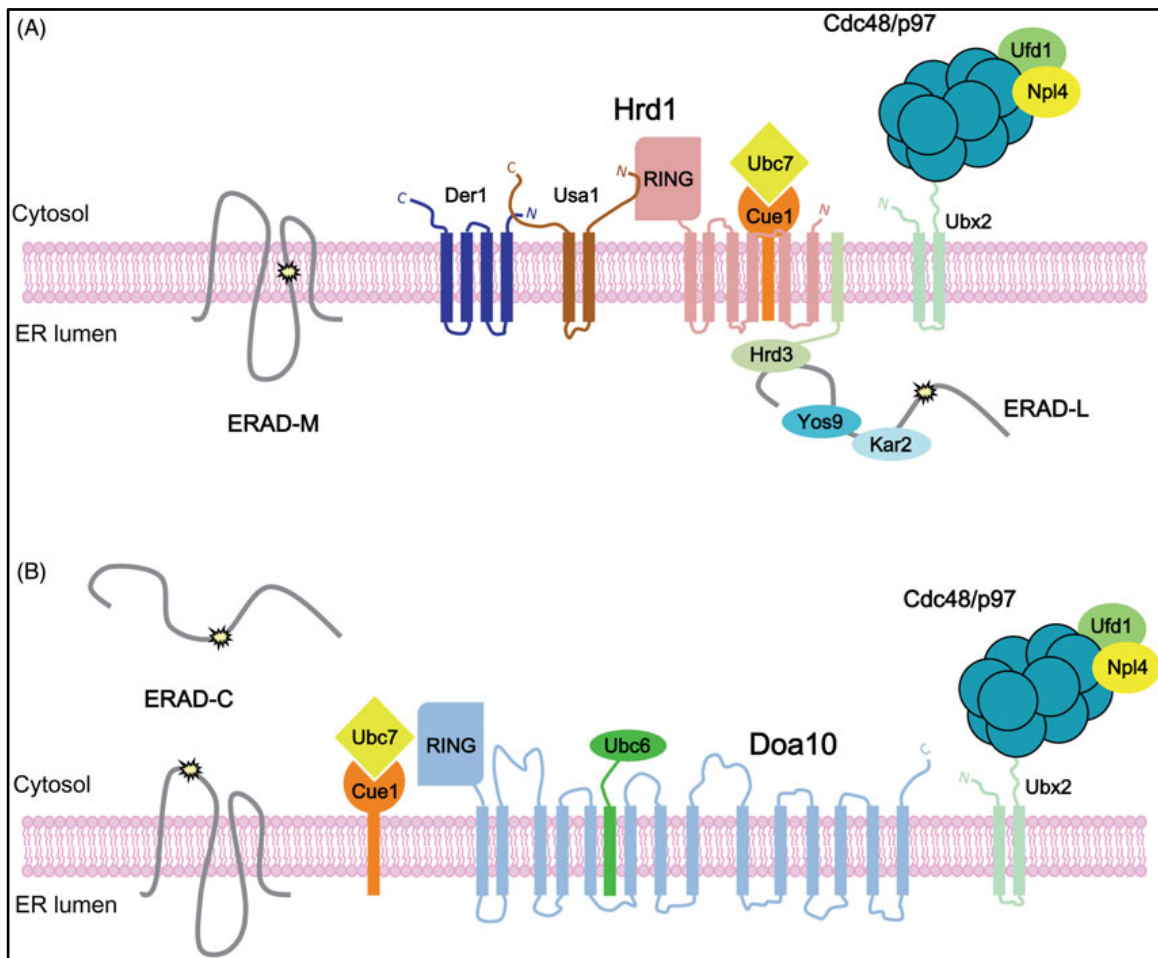


Figura 7. Complejos Hrd1 y Doa10 en *S.cerevisiae* y vías de ERAD en las que participan. De (Zattas & Hochstrasser, 2015).

El último paso de ERAD implica que los sustratos ubiquitinados sean transferidos al proteasoma 26S vía el complejo Cdc48 (p97 en mamíferos). El reclutamiento de Cdc48 al RE está mediado por la proteína transmembrana Ubx2 y en el caso de los sustratos de ERAD-M y C la proteína transmembrana Dfm1 parece también tener un papel (revisado en Berner et al., 2018). Este complejo proporcionará la fuerza motora necesaria para la retrotranslocación, vía hidrólisis de ATP, liberando a los sustratos de la membrana del RE. Durante la retrotranslocación Cdc48 reconoce a los sustratos poliubiquitinados vía Ufd1/Npl4 y un bucle desplegado en el sustrato alcanza el poro central de Cdc48. Bajo la entrada en el poro, la unión de Ufd1/Npl4 (**Figura 7**) se debilita debido al “trimming” (eliminación sucesiva) de las cadenas de ubiquitina mediado por una enzima desubiquitinasa asociada y esto facilita el paso a través del poro (revisado en Sun & Brodsky, 2019). Durante el proceso de transferencia del sustrato al proteasoma determinadas proteínas con dominios de unión a ubiquitina como es el caso de Rad23 y Dsk2 escoltan al sustrato hasta el proteasoma. La retrotranslocación de sustratos solo ocurre en el caso de proteínas TM o luminales donde es necesaria para su exposición al proteasoma citosólico y no en el caso de proteínas citoplásmicas.

Todavía se debate sobre cuál es el canal o canales para la retrotranslocación al citosol de los sustratos de ERAD. Entre los candidatos que han demostrado contribuir a este proceso se encuentran Sec61, Hrd1, Der1, Dfm1 (revisado en Sun & Brodsky, 2019) y, más

recientemente, se ha propuesto también a Doa10 (Schmidt et al., 2020), de manera que dependiendo del tipo de sustrato y sus características se usarían unos canales u otros.

N-GLICOSILACIÓN COMO SEÑAL REGULADORA DEL ACCESO A ERAD.

El control de calidad del plegamiento de proteínas está claramente asociado a la N-glicosilación, una modificación que sufren gran parte de las proteínas que entran en el RE. Los sustratos de ERAD mejor caracterizados son, de hecho, las glicoproteínas desplegadas, que son sustratos de ERAD-L. El reconocimiento de glicoproteínas desplegadas requiere de los N-glicanos ligados en una cierta conformación y también de un patch hidrofóbico expuesto que quedaría oculto en la conformación nativa (revisado en Vembar & Brodsky, 2008; Xu & Ng, 2015). A continuación, me dispongo a detallar cómo se producen estos procesos en la levadura *S.cerevisiae* y en mamíferos para que se puedan ver tanto las similitudes como las diferencias que existen entre los sistemas de ambos organismos y, por último, comentaré cómo se produce el reconocimiento y direccionamiento a ERAD-L de proteínas no glicosiladas desplegadas en su región luminal.

ERAD-L de glicoproteínas en *S.cerevisiae*.

Nada más producirse la emergencia de la cadena proteica desplegada en el lumen del RE, se produce la unión de Kar2 y las Hsp40 Scj1 y Jem1 que cooperan en el plegamiento de la proteína y contribuyen a mantener su solubilidad. Al mismo tiempo, las proteínas conteniendo sitios de N-glicosilación son modificadas covalentemente en las asparaginas de sus secuencias consenso Asn-X-Ser/Thr por la acción de la enzima oligosacaryltransferasa (OST) que transfiere el núcleo o “core” de glicanos Glc₃Man₉GlcNAc₂ (G3M9) desde un glicano unido a un lípido donador a los correspondientes residuos de asparagina. Una vez transferido el núcleo de glicanos, la proteína va a sufrir un proceso de *trimming* o eliminación sucesiva de residuos de ese núcleo, de manera que la conformación final de glicanos será la que determine si la glicoproteína es competente para la salida del RE o si, por el contrario, debe ser dirigida a la degradación por ERAD (**Figura 8**). Este proceso se inicia con la eliminación de las 2 glucosas externas gracias a la acción consecutiva de las glicosidasas Gls1 (o Cwh41) y Gls2/Gtb1 generándose la estructura G1M9 que rápidamente es de nuevo modificada por Gls2/Gtb1 hasta M9. Este glicano M9 es el punto decisivo en el cual se va a determinar si la glicoproteína está bien plegada y por lo tanto se dirige a la salida en COPII, o bien si se encuentra mal plegada y por lo tanto tiene que ser enviada a ERAD (revisado en Ninagawa et al., 2021; Xu & Ng, 2015). En el caso de que la glicoproteína se encuentre terminalmente desplegada se inicia un proceso de *trimming* de manosas que va a desembocar en una estructura de glicanos que va a ser reconocida por ERAD. Este *trimming* se inicia con la acción de la manosidasa Mns1 que da lugar a un glicano M8. En levaduras este glicano M8 se encuentra todavía tanto en proteínas plegadas que salen del RE como en glicoproteínas desplegadas por lo que Mns1 es incapaz de discriminar entre estas proteínas (Gauss et al., 2011). En el caso de glicoproteínas desplegadas este M8 es procesado luego por la hexomanosidasa Htm1 que solo ejerce su acción enzimática de *trimming* de manosas cuando forma un complejo con la proteína disulfuro isomerasa Pdi. El glicano remanente M7 (o Man₇GlcNAc₂), unido a la proteína y escoltado por las chaperonas mencionadas arriba, es reconocido por la lectina Yos9, una proteína soluble que interacciona con Hrd3 presentando así la proteína desplegada al complejo Hrd1 (**Figura 8**). Una vez ubiquitinada y

retrotranslocada, la glicoproteína ha de ser desglicosilada por una N-glicanasa, Png1, antes de que se produzca su entrada al proteasoma (revisado en Berner et al., 2018; Ninagawa et al., 2021).

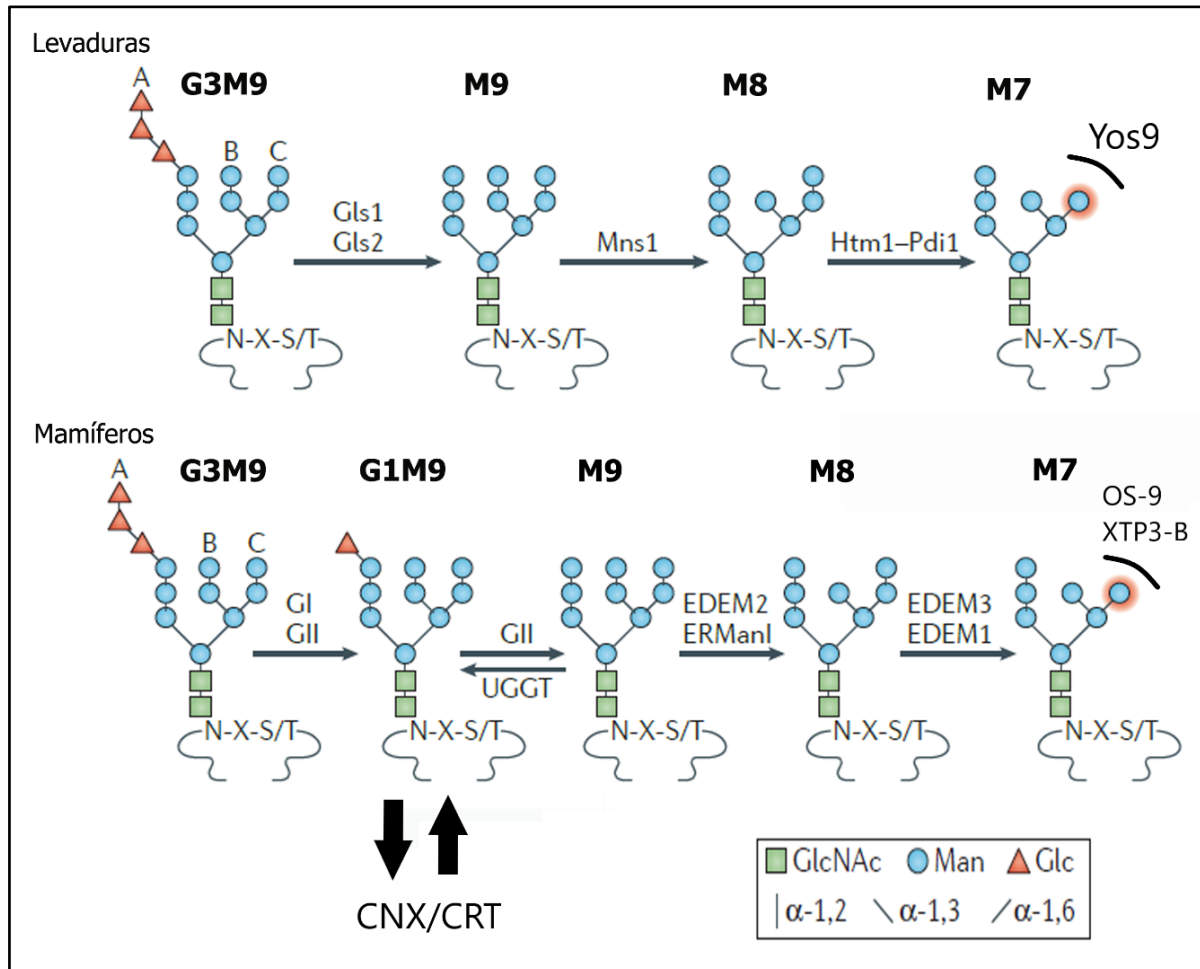


Figura 8. Procesamiento de N-glicanos durante ERAD en levaduras y mamíferos. Adaptado de (Xu & Ng, 2015).

ERAD-L de glicoproteínas en mamíferos.

Los componentes implicados en el QC de glicoproteínas en mamíferos están generalmente conservados con algunas diferencias a destacar como es el caso de la existencia del llamado ciclo calnexina/calreticulina (CNX/CRT), consecuencia de la presencia de una enzima glicosiltransferasa UGGT (UDP-Glc: glicoproteína glucosiltransferasa) en estos organismos que no se encuentra en *S.cerevisiae*, pero sí en otras levaduras.

El proceso inicial de *trimming* de glucosas es similar al de levaduras y es llevado a cabo por las glicosidasas I y II (GI y GII en este caso). Sin embargo, en el caso de mamíferos la glucosa remanente en la estructura G1M9 es más estable y tiene la capacidad de ser reconocida por las lectinas calnexina y calreticulina iniciándose el denominado ciclo CNX/CRT (**Figura 8**). Estas lectinas forman un complejo con la oxidoreductasa ERp57 contribuyendo al plegamiento de la glicoproteína. Una vez que estas han ejercido su acción, la GII elimina la

última glucosa generándose la estructura M9 (**Figura 8**). En este punto de nuevo dependiendo del estado de la proteína pueden ocurrir 3 cosas:

1) Que la glicoproteína se encuentre bien plegada, en cuyo caso continúa su procesamiento disponiéndose a la salida en COPII.

2) Que la glicoproteína requiera de algún paso de plegamiento adicional, en cuyo caso los mamíferos cuentan con una enzima glicosiltransferasa UGGT (UGGT1 o UGGT2) que reglicosila la glicoproteína de nuevo hasta G1M9, estructura que de nuevo puede ser reconocida por CNX/CRT que iniciarán una nueva ronda de plegamiento. El hecho de que en *S.cerevisiae* no exista una enzima UGGT, así como que la calnexina Cne1 no tenga tiempo para reconocer a G1M9 debido a la rapidez en el *trimming* de la tercera glucosa por Glc2/Gtb1 hace que en este organismo no exista un ciclo CNX/CRT y el papel de Cne1 en el ERQC no esté claro (revisado en Ninagawa et al., 2021).

3) Si la glicoproteína se encuentra terminalmente desplegada se inicia un proceso de *trimming* de manosas que, como en la levadura, va a desembocar en una estructura de glicanos que va a ser reconocida por ERAD (**Figura 8**). En el caso de mamíferos llevan a cabo este proceso los homólogos de Mns1 y Htm1 que son ERManI y las enzimas de la familia de proteínas EDEM respectivamente (ER degradation enhancing α -mannosidase-like protein). En este punto cabe destacar que el *trimming* de manosas en mamíferos es más extenso que en levaduras, de manera que las estructuras en forma de glicano M6 y M5 constituyen las estructuras típicas de glicoproteínas destinadas a ERAD (es decir M7-M5 son dirigidas a ERAD) (revisado en Roth & Zuber, 2016). Estas estructuras son reconocidas por los homólogos de Yos9, OS-9 y XTP3-B, que dirigen a la glicoproteína desplegada al complejo Hrd1. Una vez ubiquitinada y retrotranslocada la glicoproteína, al igual que en levaduras, ha de ser desglucosilada por una N-glicanasa antes de su entrada al proteasoma (revisado en Berner et al., 2018; Ninagawa et al., 2021).

ERAD-L de proteínas no glicosiladas.

El plegamiento de proteínas no glicosiladas con degrones en su dominio luminal se encuentra mucho menos estudiado. En levaduras el plegamiento de este tipo de proteínas es asistido por la chaperona Hsp70 Kar2, sus cofactores Hsp40 Scj1 y Jem1 y su NEF Lhs1. Si los ciclos de plegamiento llevados a cabo por estas chaperonas resultan efectivos, la proteína plegada será dirigida hacia fuera del RE en vesículas COPII. Si, por el contrario, la proteína se encuentra terminalmente desplegada entonces es direccionada a la degradación por el complejo Hrd1 (revisado en Ninagawa et al., 2021). Aunque se sabe que Yos9 puede también reconocer ciertas proteínas no glicosiladas (Jaenicke et al., 2011), no está claro cuáles son los factores implicados en los últimos pasos del reconocimiento de proteínas no glicosiladas por la maquinaria de ERAD-L.

En mamíferos el proceso es similar participando BiP, sus cochaperonas y el NEF Grp170, aunque es importante destacar que, de acuerdo con los datos, mientras en levaduras la vía ERAD-L de glicoproteínas es más eficiente que la de proteínas no glicosiladas, en mamíferos sucede lo contrario (revisado en Ninagawa et al., 2021).

2.4.2. INMAD y control de calidad nuclear.

En el núcleo también existe toda una maquinaria de ubiquitinación implicada en el PQC. Esta maquinaria, incluida dentro de la ruta UPS, es a lo que denominamos el sistema INMAD. En INMAD al igual que en ERAD tienen lugar los procesos de reconocimiento del sustrato, retrotranslocación (cuando es necesaria), ubiquitinación y degradación en el proteasoma (en este caso localizado en el núcleo) y la clasificación del tipo de vía o degrón (ERAD-M-L o C) se mantiene. Dentro de INMAD nosotros destacamos el papel de 2 complejos TM E3 localizados en la MNI:

-El complejo DOA10: Ya lo habíamos comentado en el apartado de ERAD ya que es una de las E3s canónicas de ERAD. Doa10 se puede encontrar también en la MNI (además de en la membrana del RE) donde se ha visto que puede contribuir a la degradación de sustratos nucleares como es el caso del represor transcripcional MAT α 2 (Swanson et al., 2001) y de sustratos localizados en la MNI como la proteína transmembrana Asi2 (Boban et al., 2014). Además de regular los niveles de dichos sustratos plegados, es posible que reconozca proteínas TM desplegadas que habrían evadido ERAD en el RE difundiendo hasta la MNI, donde podrían ser reconocidas por este complejo, ya sea a través de sus degrones expuestos al nucleoplasma (ERAD-C), o bien a través de sus degrones transmembrana (ERAD-M).

-El complejo ASI (Figura 9). Este complejo se describió inicialmente en *S.cerevisiae* (Forsberg et al., 2001) y no cuenta con un homólogo en mamíferos. Está compuesto por 2 E3s transmembrana, Asi1 y Asi3, y un adaptador transmembrana Asi2. Asi1 y Asi3 contienen un dominio catalítico RING al igual que Hrd1 y Doa10. Este complejo funciona con las E2s Ubc6 y Ubc7 y también se ha reportado un papel para Ubc4 (Foresti et al., 2014). Los sustratos de Asi incluyen tanto proteínas solubles como proteínas TM y pueden ser de distinto tipo:

- Proteínas TM deslocalizadas que normalmente se encuentran en el RE, vacuola u otros compartimentos de membrana. En este caso se dice que Asi contribuye a mantener la identidad de la MNI (Khmelinskii et al., 2014). Cabe destacar que estas proteínas pueden estar o no desplegadas.
- Subunidades huérfanas plegadas de complejos proteicos, pero desensambladas (Natarajan et al., 2020) que serían capaces de evadir ERAD. La existencia de este mecanismo en levaduras sugiere que en este organismo existe un desacoplamiento espacial entre los procesos de ensamblaje de los complejos (en el RE) y el QC de dicho ensamblaje (en el núcleo).
- Proteínas TM del RE o de la MNI con degrones en dominios transmembrana, es decir, sustratos de ERAD-M (Foresti et al., 2014; Khmelinskii et al., 2014).
- Proteínas nucleares/citosólicas o de la MNI cuyos niveles han de ser regulados. Este es el caso por ejemplo de los primeros sustratos caracterizados de Asi, los factores de transcripción Stp1 y Stp2, que funcionan como efectores de una vía de señalización que detecta la presencia de aminoácidos extracelulares y regula la expresión de permeasas de aminoácidos específicas (revisado en Franić et al., 2021).

Se ha demostrado que Asi1 y Asi3 pueden reconocer sus sustratos transmembrana vía interacción directa a través de sus propios dominios transmembrana (Natarajan et al., 2020). En algunos casos ese reconocimiento se produce por Asi2 que luego se encargaría de direccionar al sustrato a las E3s para la ubiquitinación, mientras que en otros casos la

degradación de sustratos de Asi no parece requerir de Asi2. En cuanto al reconocimiento de sustratos solubles, todavía no se sabe muy bien cómo se produce.

Con respecto a cómo tendría lugar el acceso de proteínas integrales de la membrana del RE a la MNI para la degradación por este complejo, se sabe que las proteínas TM con dominios extraluminales de hasta 60kDa pueden alcanzar la MNI por difusión lateral desde la membrana del RE vía la membrana nuclear del complejo de poro, mientras que otras proteínas podrían requerir de un mecanismo de transporte activo para su acceso al núcleo (Meinema et al., 2012).

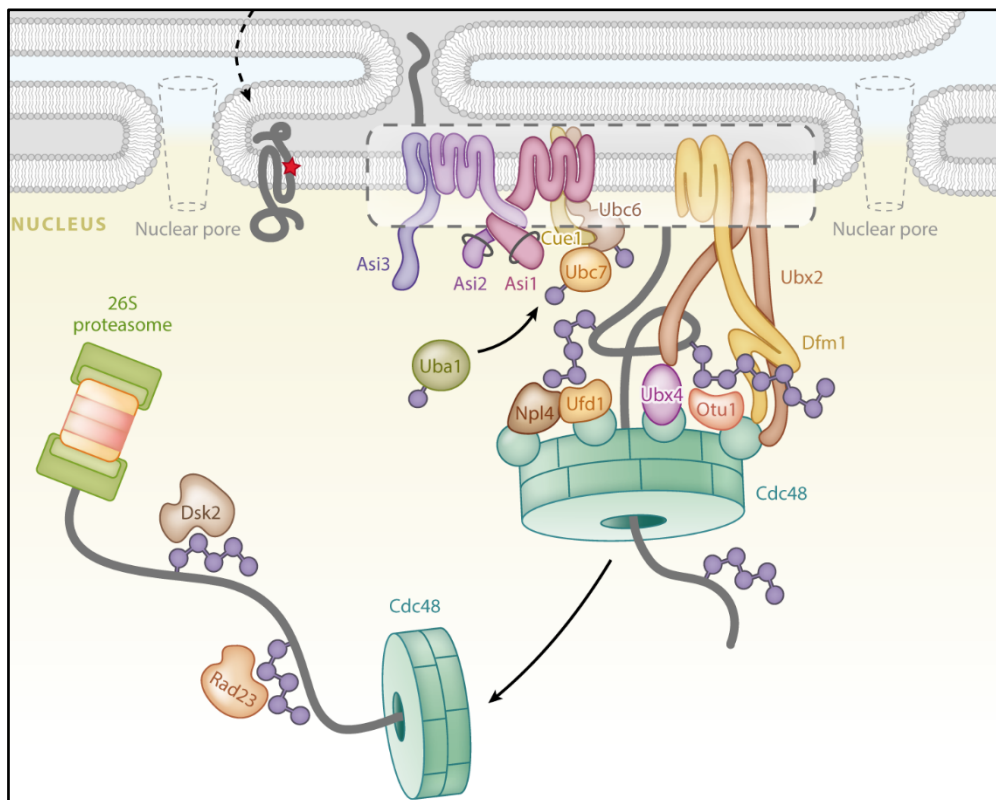


Figura 9. Complejo Asi de *S. cerevisiae*. Adaptado de (Berner et al., 2018).

Otras E3s implicadas en el control de calidad en el núcleo.

Existen otras E3s encargadas del control de calidad en el núcleo entre las que destacan la E3 San1 y el complejo promotor de anafase APC/C. No existe un consenso generalizado sobre si estos sistemas forman o no parte del INMAD, por lo que hemos decidido describirlas aparte.

El complejo APC/C está formado por múltiples subunidades presentando una de ellas un dominio RING. Las E2s que funcionan con este complejo en levaduras de gemación son Ubc1, Ubc4 y Ubc7. Este complejo esencialmente tiene funciones reguladoras contribuyendo a la degradación de sustratos solubles en determinados momentos del ciclo celular, aunque recientemente se ha visto que también es capaz de mediar la degradación de Mps3, una proteína de la MNI con un dominio SUN conservado (revisado en Koch & Yu, 2019; Franić et al., 2021).

San1 es una E3 nuclear con un dominio catalítico RING que participa en la degradación de proteínas desplegadas tanto del núcleo como citoplásmicas que acceden al núcleo. Esta E3 trabaja preferentemente con las E2s Ubc1 y Ubc3 y a través de sus dominios desestructurados es capaz de reconocer directamente a sus sustratos, caracterizados por presentar regiones hidrofóbicas de alta insolubilidad (revisado en Franić et al., 2021).

Mientras que APC/C se encuentra altamente conservado, no se han encontrado homólogos para San1. El estudio de todas estas E3s implicadas en el control de calidad nuclear es esencial, se encuentren o no conservadas, ya que existen múltiples E3s de mamíferos que deben de seguir vías similares y que apenas han sido estudiadas. De hecho, se ha descrito recientemente que la degradación del receptor de lámina B se produce en un proceso similar a ERAD/INMAD, aunque sus componentes no se han identificado todavía (Tsai et al., 2016).

2.4.3. RETICULOFAGIA (AUTOFAGIA DEL RE).

En el ERQC además de la eliminación de proteínas llevada a cabo por los sistemas de ERAD/INMAD de la ruta UPS, existe degradación de ciertas proteínas en la vacuola por reticulofagia. Este término se puede definir como el proceso por el cual se produce la degradación en la vacuola/lisosoma de fragmentos del RE, que pueden contener proteínas plegadas y/o desplegadas, así como agregados. Más aún, recientemente se ha demostrado que la reticulofagia puede contribuir a la degradación de proteínas desplegadas resistentes a ERAD (revisado en Wilkinson, 2019). La reticulofagia se induce normalmente en casos de estrés en el RE (puede ser provocada por distintos factores) como es el caso de la escasez de nitrógeno o la acumulación de ciertas proteínas desplegadas agregadas. Dentro de la reticulofagia podemos hablar de 3 vías (revisado en Chino & Mizushima, 2020; **Figura 10**):

- **Macroreticulofagia:** En esta vía fragmentos del RE, donde se pueden encontrar ciertas proteínas, son secuestrados por el crecimiento de una vesícula de doble membrana (el fagóforo) que luego se cierra dando lugar al autofagosoma, el cual se fusiona posteriormente con la vacuola. En este caso la maquinaria general de autofagia (proteínas ATG) es necesaria y en algunos casos (macroreticulofagia selectiva) se requieren receptores de carga como es el caso de los receptores Atg39 (envuelta nuclear) y Atg40 (membrana del RE) en levaduras (Farré & Subramani, 2016). Estos receptores presentan motivos de interacción con Atg8, proteína clave para el proceso de expansión del fagóforo. Recientemente se ha descrito también la implicación de vesículas específicas COPII formadas por Sec23 y la variante de Sec24 Lst1 (Sec24C en mamíferos), que concentran proteínas agregadas en dominios especializados del RE (distintos a los ERES) y contribuyen a su degradación en asociación con Atg40 (Cui et al., 2019).
- **Microreticulofagia:** En esta vía no se produce la formación del autofagosoma. Se basa en la formación ante estrés de unos pliegues del RE (Schuck et al., 2014), donde se pueden encontrar ciertas proteínas, que acceden a la vacuola a través de la invaginación de la propia membrana vacuolar. La microautofagia de estos pliegues no requiere de las proteínas ATG, pero sí parece precisar en último término del complejo ESCRT para la escisión de la membrana vacuolar (revisado en Schuck, 2020).

- Vía de liberación vesicular: Alternativamente a las vías anteriores, se ha descrito recientemente un mecanismo por el cual se produce la gemación de vesículas del RE conteniendo proteínas desplegadas que se fusionan directamente con la vacuola (Fregno & Molinari, 2019; Fregno et al., 2018).

Es importante destacar que al igual que el estrés, el marcaje con ubiquitina de una proteína desplegada y/o agregada constituye una señal para el inicio de la reticulofagia y para el reconocimiento por la maquinaria autofágica. En este caso las cadenas de poliubiquitina se dan normalmente con uniones K63, a diferencia de las K48 típicas de la degradación proteasomal (revisado en Dikic, 2017).

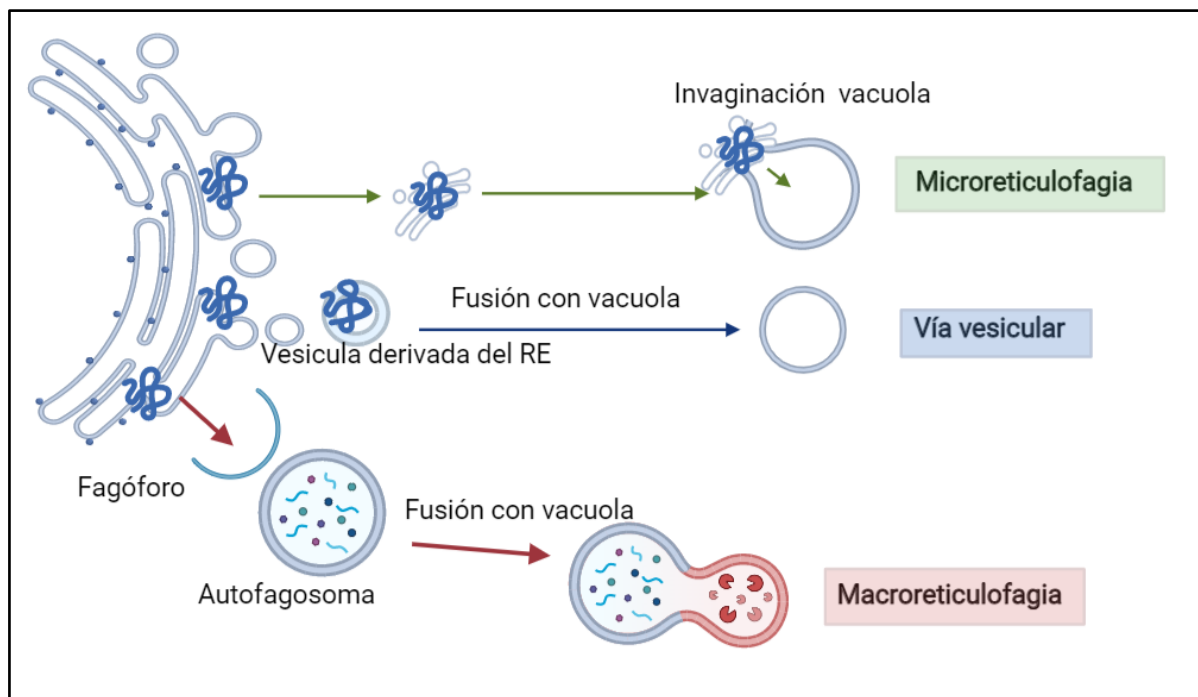


Figura 10. Vías de reticulofagia en levaduras.

2.5. CONTROL DE CALIDAD EN EL GOLGI (GQC).

El complejo de Golgi, además de constituir una importante factoría de modificación proteica (N-glicosilación, acetilación, fosforilación, etc), funciona también como un *checkpoint* de control de calidad en la vía secretora. Por lo tanto, se habla de un control de calidad en el Golgi o Golgi Quality Control (GQC) y dentro de este de un GQC que dirige proteínas a la degradación por ERAD o a vías de replegamiento/reensamblaje y de un GQC que dirige proteínas a la degradación en la vacuola.

GQC que dirige proteínas a la degradación por ERAD o a vías de replegamiento/reensamblaje.

En levaduras de gemación se ha visto que existe un control de calidad en el compartimento cis-Golgi, de manera que ciertos sustratos de ERAD-L o con defectos en su ensamblaje (en el caso de complejos multiméricos) u oligomerización son reconocidos en este compartimento (Caldwell et al., 2001; Taxis et al., 2002; Vashist & Ng, 2004; Sato et al., 2004; Sacristan et al., 2013) y reciclados de vuelta al RE en vesículas COPI, ya sea para ser dirigidos a ERAD o para completar su ensamblaje u oligomerización (revisado en Sun & Brodsky, 2019; Geva & Schuldiner, 2014).

Entre los receptores que son capaces de reconocer proteínas con dichas características en el Golgi se encuentran el receptor Erv29 que parece viajar con ciertos sustratos de ERAD-L ciclando entre el RE y el Golgi (Caldwell et al., 2001; Vashist et al., 2001), el receptor Rer1 que puede reconocer tanto proteínas desplegadas como subunidades de complejos desensamblados (y su homólogo en mamíferos ERp44) o el receptor KDEL en mamíferos (Sato et al., 2003 y 2004; revisado en Tempio & Anelli, 2020; Yamamoto et al., 2001).

GQC que dirige proteínas a la degradación en la vacuola.

Ciertas proteínas desplegadas son capaces de evadir el ERQC y de pasar la barrera del reciclado por COPI alcanzando el TGN/EE. En este compartimento estas pueden ser reconocidas para su degradación en la vacuola en lo que constituiría un nivel adicional de QC en el Golgi. Podemos distinguir dos mecanismos diferentes para llevar a cabo este tráfico a la vacuola: uno mediado por receptor y otro mediado por ubiquitín ligasas (revisado en Sun & Brodsky, 2019).

En el mecanismo mediado por receptor el reconocimiento del cargo desplegado (aparentemente sería un cargo soluble) se produce a través del receptor Vps10 (o su homólogo sortilina en mamíferos) a nivel del TGN (Hong et al., 1996; Gelling et al., 2012). Este receptor reconocería al cargo y a su vez interaccionaría con el adaptador de clatrina GGA formándose vesículas que se acabarían fusionando con el PVC desde donde se iniciaría la ruta del cuerpo multivesicular para la degradación definitiva en la vacuola. Esta ruta sería similar a la seguida por la proteína CPY sin que se conozca en detalle como el sistema es capaz de reconocer a las proteínas desplegadas para incorporarlas a esta ruta.

El otro mecanismo de control, descrito para proteínas TM desplegadas que alcanzan el TGN/EE, depende de la ubiquitinación de estas por distintas E3s ubiquitina ligasas. Una vez ubiquitinadas, las proteínas desplegadas quedarían marcadas para su procesamiento a través de la ruta del cuerpo multivesicular, de forma similar a lo que ocurre para las proteínas que provienen de la MP a través de la vía endocítica. En levaduras las E3s que median estos procesos de ubiquitinación en el TGN/EE son las proteínas Tul1 y Rsp5.

Tul1 es una proteína politópica con 7 dominios TM que se ha identificado como una E3 que presenta un dominio RING catalítico en su extremo C-terminal (revisado en Sardana & Emr, 2021). Esta proteína es capaz de reconocer residuos polares dentro de segmentos transmembrana en la proteína desplegada y trabaja junto con la E2 Ubc4 para mediar la

ubiquitinación de sus cargos. Tul1 puede ser reclutada por distintos adaptadores a distintos compartimentos de la vía secretora tardía entre los cuales se incluyen no solo el TGN, sino también los endosomas y la membrana de la vacuola (revisado en Sun & Brodsky, 2019).

Rsp5 es una E3 ubiquitina ligasa de la familia NEDD4 con un dominio ligasa catalítico HECT en su extremo C-terminal. En su extremo N-terminal se encuentra una región C2 de unión a membrana y en la zona central presenta 3 motivos WW que se unen a los motivos PY (PPxY) presentes en sus cargos o adaptadores (revisado en Sardana & Emr, 2021). Aunque más conocida por su papel en el marcaje de proteínas de la MP al final de su ciclo de vida para su endocitosis (revisado en MacGurn, 2012), también se encarga del marcaje con ubiquitina de proteínas desplegadas y de proteínas que se encuentran en exceso como es el caso de sustratos sobreexpresados de ERAD o ciertos transportadores en determinadas condiciones celulares (revisado en Sun & Brodsky, 2019). Al tratarse de una proteína citosólica el acceso a sus cargos normalmente depende de una serie de proteínas adaptadoras solubles o TM que la reclutan a distintos compartimentos entre los que se incluyen no solo el TGN, sino también otros compartimentos post-Golgi como es el caso de la membrana de la vacuola, la membrana endosomal o la MP (revisado en Sardana & Emr, 2021). Por lo tanto, la existencia de múltiples proteínas adaptadoras, transmembrana o solubles, permite ampliar el rango de sustratos y compartimentos donde se ejerce el QC mediado por las ubiquitin ligasas Tul1 y Rsp5 en levaduras.

Resumiendo, el Golgi cuenta con dos puntos de control, uno en el cis-Golgi y otro en el TGN/EE. En muchas ocasiones las proteínas sustrato de este GQC han escapado al ERQC ya sea porque carecen de señales de unión a factores de plegamiento/retención del RE, no presentan degrones o señales para ser reconocidas por la maquinaria de degradación presente en ese compartimento o porque simplemente se encuentran en exceso.

2.6. CONTROL DE CALIDAD EN LA MP O PMQC.

Hasta hace muy poco tiempo apenas se sabía nada sobre los mecanismos de control de calidad que operan en la MP a pesar de la enorme variedad y de la importancia de los procesos fisiológicos que ocurren en este compartimento como es el caso de la toma de nutrientes, el flujo de iones o a la transducción de señales externas. Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto la importancia de la ubiquitinación como señal que marca el desplegamiento de proteínas en la MP. Se desconoce todavía cómo se produce la detección del desplegamiento en dominios extracelulares ya que no se sabe cómo esos defectos serían capaces de transducir una señal a la maquinaria citosólica de ubiquitinación. En cualquier caso, lo que está claro es que estos mecanismos se basan en el marcaje con ubiquitina del cargo para su posterior entrada por endocitosis al citosol e incorporación a la ruta del cuerpo multivesicular.

En levaduras la ubiquitina ligasa Rsp5, también implicada en el GQC, participa en el reconocimiento y marcaje con ubiquitina de proteínas de membrana. Este reconocimiento afectaría a proteínas desplegadas, dañadas, o que simplemente ya han ejercido su función, las cuales serían marcadas para su endocitosis y posterior degradación en la vacuola. Estudios recientes han demostrado que la red formada por Rsp5 y sus arrestinas o ARTs (Arrestin-related trafficking adaptors) está implicada en el reconocimiento y ubiquitinación de

proteínas desplegadas de la MP (Nikko & Pelham, 2009; Lin et al., 2008; Zhao et al., 2013) (**Figura 11**). En el genoma de *S.cerevisiae* existen hasta 15 genes de arrestinas: 14 para α -arrestinas y uno para la proteína Vps26. Estas 14 α -arrestinas son Art1-10, Bul1-3 y Spo23 (revisado en Kahlhofer et al., 2021) y se caracterizan por contar con uno o más dominios PY (PPxY) en su región C-terminal, lo que las permite interactuar con los motivos WW presentes en una numerosa cantidad de proteínas entre las que se incluyen las E3s ubiquitin ligasas de la familia Nedd4 cuyo único miembro en levaduras es la mencionada Rsp5.

Además de las arrestinas, que son proteínas solubles, se han encontrado también otras proteínas transmembrana adaptadoras de Rsp5 en la MP como es el caso de las proteínas Tre1, Tre2 y Rcr1 (revisado en Sardana & Emr, 2021).

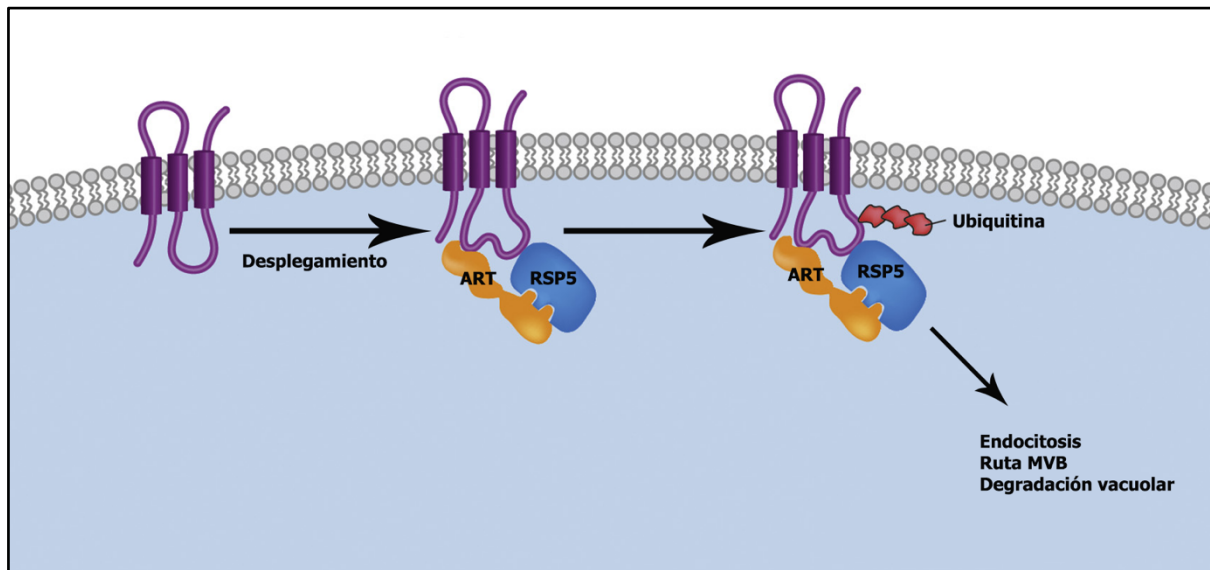


Figura 11. PMQC en levaduras. Adaptado de (MacGurn, 2014).

Una curiosidad con respecto a Rsp5 es que sus homólogos en mamíferos no desempeñan papel alguno en el PMQC o GQC. En mamíferos la ubiquitin ligasa CHIP es capaz de ubiquitinar proteínas desplegadas en la MP. CHIP contiene un dominio C-terminal U-box responsable del reclutamiento de enzimas E2 y un dominio N-terminal capaz de interactuar con las chaperonas Hsc70 y Hsp90. En este caso dichas chaperonas actuarían como adaptadores en el primer paso de reconocimiento del sustrato, reclutando estas después a CHIP para que lleve a cabo el proceso de ubiquitinación (revisado en MacGurn, 2014).

2.7. RESUMEN DE SISTEMAS DE QC.

En la **Figura 12** se presenta un resumen de todos los sistemas/mecanismos de QC descritos en esta introducción.

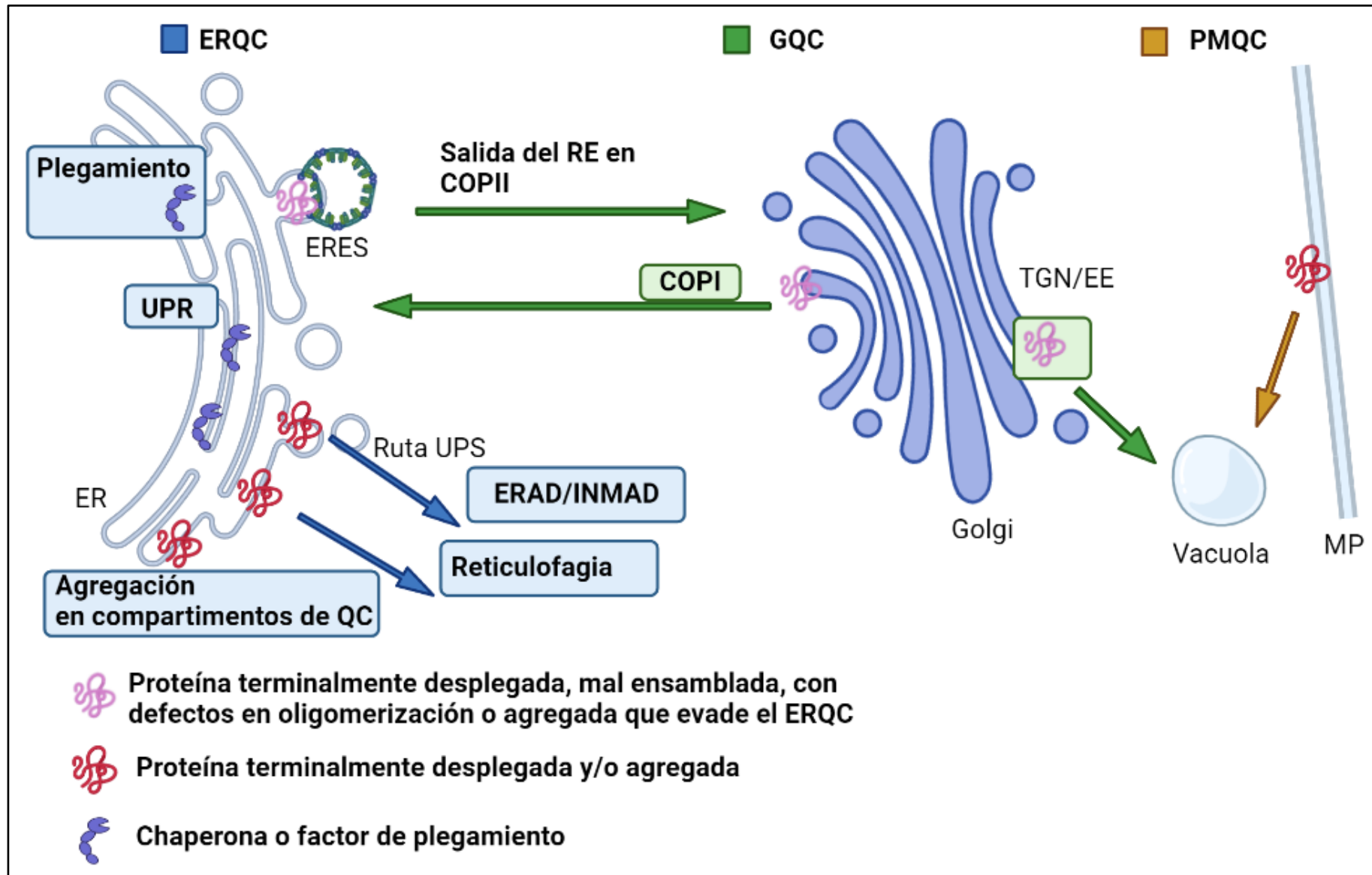


Figura 12. Figura resumen de todos los sistemas de QC celular que operan en la vía secretora.

3. SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y Chs3 COMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con toda una serie de características que la convierten en un organismo ideal para la investigación:

- Es un organismo eucariota con su genoma secuenciado y la mayoría de sus procesos celulares están conservados en humanos. De hecho, al menos un 60% de los genes de esta levadura tienen una homología robusta o al menos un dominio conservado con genes humanos (Botstein et al., 1997).
- Facilidad y seguridad en su manipulación. Además, crece rápidamente y su transformación y aislamiento de mutantes es sencillo.
- Existen numerosas colecciones de mutantes, librerías de plásmidos, bases de datos y herramientas de genómica y proteómica que facilitan el trabajo a gran escala y el procesamiento de una gran cantidad de datos (revisado en Mustacchi et al., 2006).

En el contexto de este trabajo debemos señalar también que, debido a lo anteriormente descrito, *S.cerevisiae* se ha convertido a lo largo de los años en el modelo por excelencia en el estudio del tráfico intracelular de proteínas.

En este trabajo partimos de la proteína de *S.cerevisiae* Chs3 que constituye la principal quitín sintasa implicada en la síntesis de quitina en levaduras, un polímero estructural de su pared celular. La quitina se deposita principalmente en cuello y punta de la yema durante la citocinesis, en la base de los “*shmoos*” en conjugación o a lo largo de toda la membrana de las ascosporas en esporulación (revisado en Roncero, 2002). El transporte polarizado y regulado de Chs3 resulta clave para que esta proteína ejerza su función en la localización y en el momento preciso del ciclo celular.

Recientemente esta proteína se ha erigido como un auténtico paradigma para el estudio del tráfico intracelular de proteínas en general y, más en concreto, de proteínas de membrana politópicas, al recapitular aparentemente todas y cada una de las etapas del tráfico descritas hasta el momento. Es por esto por lo que esta proteína resulta ideal para el estudio de los mecanismos de transporte intracelular y de control de calidad a lo largo de la vía secretora.

3.1. Tráfico intracelular de Chs3 en *S.cerevisiae*.

Como cualquier proteína transmembrana de la MP, Chs3 sigue la vía secretora. Su síntesis se inicia en los ribosomas asociados al RE desde donde Chs3 es translocada a la membrana de este orgánulo. La proteína carece de péptido señal y su dominio N-terminal es citosólico por lo que se define como una proteína TM de tipo II. Una vez sintetizada y translocada al RE, Chs3 debe ser plegada correctamente para su salida del RE.

Se ha demostrado que Chs7 actúa como chaperona específica de Chs3 (Trilla et al., 1999), ejerciendo un papel similar al de otras proteínas del RE como Shr3, Pho86 o Gsf2 que actuarían como chaperonas para sus correspondientes sustratos: permeasas de aminoácidos

(AAPs), Pho84 o Hxt1-2, respectivamente (Kota & Ljungdahl, 2005). Todas ellas son proteínas integrales de membrana que facilitarían el plegamiento de sus sustratos politópicos para permitir su salida hacia el Golgi. A mayores se ha demostrado que Chs3 es palmitoilada por la palmitoiltransferasa Pfa4 (Lam et al., 2006), lo que, de alguna forma no totalmente esclarecida, también contribuye a su plegamiento. Se sabe además que Chs3 está N-glicosilada, aunque se desconoce el papel de esta modificación postraducciona sobre la proteína puesto que ésta es totalmente funcional en ausencia de N-glicosilación (Sacristan et al., 2013).

En ausencia de cualquiera de estos 2 procesos, plegamiento mediado por Chs7 y palmitoilación (Trilla et al., 1999; Lam et al., 2006), Chs3 se retiene y acumula en el RE. Cabe destacar que el papel de Chs7 ha sido revisado recientemente proponiéndose un modelo en el cual esta chaperona es capaz de formar un complejo con Chs3 y viajar con la quitín sintasa hasta la MP, ejerciendo funciones no solo como chaperona, sino también como regulador de la actividad de Chs3 en la MP (Dharwada et al., 2018) (**Figura 13**).

Adicionalmente a estos procesos, se sabe que Chs3 es capaz de oligomerizar en el RE a través de su región N-terminal y que mutantes con truncaciones en ese dominio se retienen parcialmente en el RE a través de un mecanismo de control de calidad que devuelve a estas proteínas en vesículas COPI desde el cis-Golgi donde son reconocidas por el receptor Rer1 (Sacristan et al., 2013).

Cuando la proteína adquiere la conformación competente para su salida del RE (palmitoilación y plegamiento) es reconocida por su adaptador Erv14 y sale en vesículas COPII hasta el complejo de Golgi (Sacristan et al., 2013). Una vez en el TGN/EE, se dirige de forma polarizada a la MP a través del exómero (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Este complejo se ha descrito en detalle en *S. cerevisiae* y presenta características intermedias entre una cubierta y un complejo adaptador. El exómero es estructuralmente un tetrámero formado por 2 copias de la proteína Chs5 y 2 copias de cualquiera de los miembros de las denominadas ChAPs (Chs5 and Arf1 binding proteins): Chs6, Bch1, Bch2 y Bud7 (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Mientras que Chs5 tiene esencialmente una función estructural, reclutándose inicialmente al TGN/EE en asociación a Arf1-GTP y uniéndose a las ChAPs, las ChAPs además de interactuar también con Arf1-GTP y la membrana lipídica, median la interacción con los cargos (Paczkowski et al., 2012; Paczkowski & Fromme, 2014; Huranova et al., 2016).

Una vez en la MP, Chs3 se recluta al anillo de septinas gracias a su interacción con Chs4 que se encuentra conectada a este anillo a través de su unión directa con la proteína Bni4. Chs4 media la activación de Chs3, que ejerce aquí su función enzimática como CSIII en síntesis de quitina en la MP (**Figura 13**). Se desconoce el mecanismo exacto de activación de la CSIII por Chs4. Tras haber ejercido su acción o cuando la célula así lo demanda, Chs3 se disocia del anillo y se inactiva al ser endocitada (Reyes et al., 2007; Sacristan et al., 2012). Una vez endocitada, se sabe que la mayor parte de Chs3 se recicla hasta el TGN/EE vía el complejo AP-1 (Valdivia et al., 2002) y las epsinas Ent3 y Ent5 (Copic et al., 2007) ayudando a mantener un reservorio intracelular de la proteína en el TGN/EE, desde donde podría volver a salir a la MP fácilmente en respuesta a la demanda celular. Recientemente se ha visto que el retrómero también es capaz de llevar a cabo el reciclado de Chs3 desde los endosomas tardíos (Arcones et al., 2016).

Según el modelo actual, la proteína que llega a la MP se ubiquitina en su dominio N-terminal por Rsp5 que reconoce a Chs3 a través de la arrestina adaptadora Art4 (Arcones et al., 2016). Esta parte de la proteína sería la que es dirigida a la vacuola para su degradación definitiva por la ruta del cuerpo multivesicular.

Adicionalmente a la vía mediada por el exómero, se sabe que existe una vía alternativa para el transporte no polarizado de Chs3 a la MP. Dicha vía se abre cuando se deletan AP-1, las dos epsinas (Ent3 y 5) o las GGAs (Gga1 y 2) al eliminar la retención que presentan todos estos adaptadores sobre Chs3 a nivel del TGN/EE (Valdivia et al., 2002; Copic et al., 2007). Igualmente, la eliminación de alguna de las señales presentes en Chs3 para el reconocimiento por estos adaptadores, como es el caso de su señal de retención por AP-1, permite la apertura de esta vía (Starr et al., 2012).

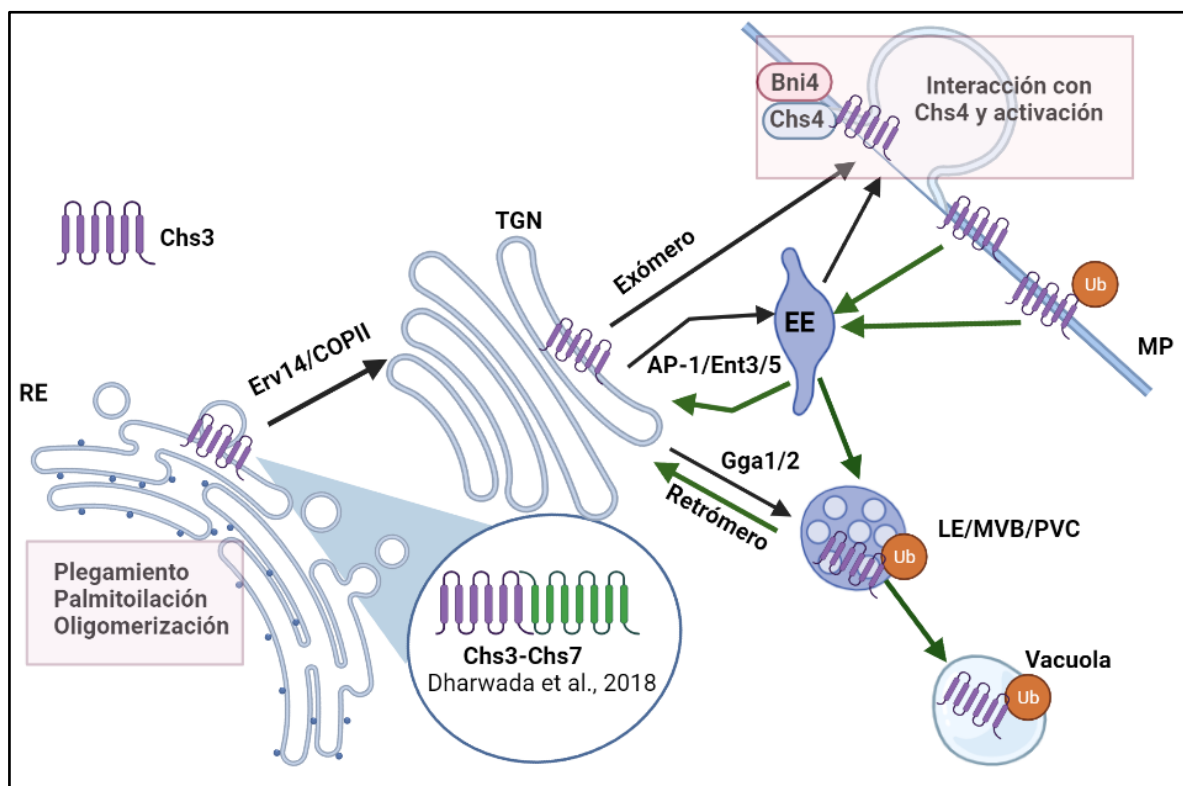


Figura 13. Tráfico intracelular de Chs3. En negro: vías de transporte anterógrado. En verde: vías de transporte retrógrado (reciclaje y degradación). Por razones didácticas y facilidad de representación se representa el EE como un compartimento separado del TGN aunque en *S.cerevisiae* solo hay un compartimento TGN/EE.

3.2. Topología y señales implicadas en el tráfico intracelular de Chs3.

Chs3 es una proteína TM politópica con 6 dominios transmembrana de acuerdo con el modelo topológico más consistente, conteniendo tres dominios citosólicos y un dominio extracelular (**Figura 14**).

En el dominio N-terminal de la proteína, antes del primer dominio transmembrana, encontramos toda una plataforma de señales para la unión de distintos adaptadores/complejos: AP-1, exómero y retrómero (Starr et al., 2012; Weiskoff & Fromme, 2014; Arcones et al., 2016). Además, es esta región a través de la cual se produce la oligomerización de la proteína (Sacristan et al., 2013), región que además se encuentra fosforilada y ubiquitinada.

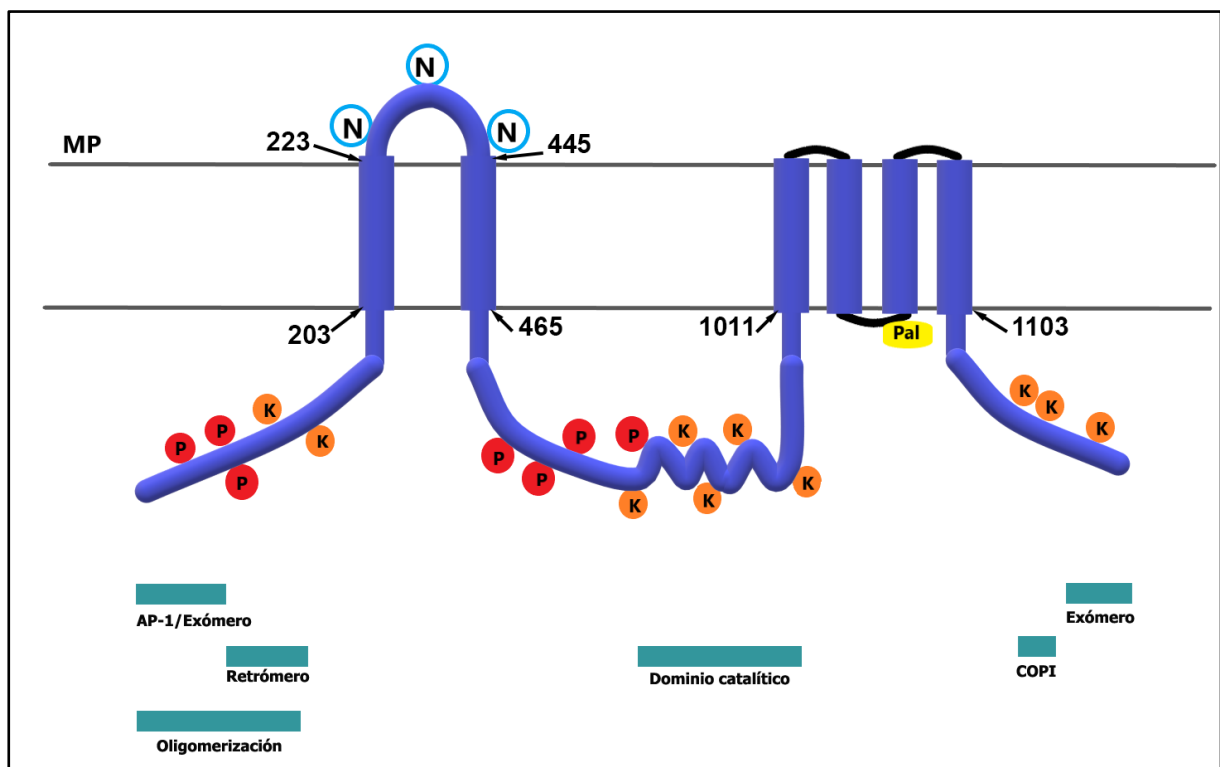


Figura 14. Topología, modificaciones postraduccionales (N= Sitios de N-glicosilación, P= Sitios de fosforilación, K=Sitios de ubiquitinación, Pal= Sitio de palmitoilación; localización aproximada en las distintas regiones) y funciones en transporte intracelular u otros procesos de cada región de Chs3.

Entre los dos dominios transmembrana iniciales se encuentra el dominio luminal de la proteína donde se sitúan los 3 sitios de N-glicosilación (posiciones 303, 332 y 371), aunque hasta el momento no se ha logrado atribuir función alguna a esta modificación sobre el tráfico o función de la proteína (Cos et al., 1998; Zielinska et al., 2012; Sacristan et al., 2013). Después del segundo dominio transmembrana encontramos una larga región citosólica central en la cual se encuentra el dominio con actividad quitín sintasa QRRRW (aminoácidos 992-996) (Cos et al., 1998).

Por último, Chs3 posee 4 hélices transmembrana muy próximas entre sí que desembocan en un dominio citosólico C-terminal. En este dominio se han encontrado señales para el reconocimiento por el exómero (Rockenbauch et al., 2012) y COPI (Sacristan et al., 2013) y además se sabe que esta región posee un papel directo en la síntesis de quitina (Cos et al., 1998).

Chs3 está altamente modificada ya que aparte de la N-glicosilación ya comentada, la proteína se encuentra fosforilada en múltiples sitios (Li et al., 2007), palmitoilada (Lam et al., 2006) y ubiquitinada (Peng et al., 2003; Arcones et al., 2016). Al igual que para la N-glicosilación, no se ha logrado atribuir papel alguno a la fosforilación de Chs3, pero la palmitoilación es necesaria para la salida del RE (Lam et al., 2006) y la ubiquitinación en su dominio N-terminal regula su tráfico a la vacuola (Arcones et al., 2016).

3.3. Control de calidad de Chs3. Antecedentes.

Hasta la fecha no se ha estudiado a fondo el control de calidad de Chs3, sobre todo porque se había asumido que Chs3 era una proteína extremadamente estable y no sujeta a degradación proteolítica (Ziman et al., 1996). Sin embargo, hoy sabemos que las proteínas truncadas en el dominio de oligomerización de Chs3 son recicladas al RE tras ser reconocidas en el cis-Golgi por el receptor Rer1 y empaquetadas en vesículas COPI (Sacristan et al., 2013). Esto mismo ocurre en el mutante de palmitoilación *pfa4Δ* donde Chs3 también se reconoce en el cis-Golgi para ser devuelta vía COPI al RE. En este último caso se ha visto que la delección de Bre5 y/o Ubp3 suprime la retención en el RE de Chs3 sin palmitoilar permitiendo su salida a la MP donde es funcional (Lam Thesis, 2009).

No existe evidencia alguna hasta el momento de que Chs3 sea sustrato de ERAD o del proteasoma, por lo que el final de su ciclo de vida pasaría por su degradación en la vacuola tras su marcaje con ubiquitina en la MP por Rsp5/Art4, algo que ha sido demostrado recientemente (Arcones et al., 2016).

Debido a los múltiples dominios y modificaciones postraduccionales que presenta esta proteína politópica, Chs3 constituye una proteína modelo ideal para estudiar cómo y a través de que regiones se produce el control de calidad de esta proteína a lo largo de la vía secretora en distintas condiciones. Esto permitiría no solo un avance en el conocimiento de los mecanismos de control de calidad que participan durante el tráfico de Chs3, sino también en el estudio de los mecanismos de control de calidad en general, y de proteínas politópicas en particular, al encontrarse estos mecanismos altamente conservados en eucariotas.

OBJETIVOS

Objetivos.

El objetivo de partida de este proyecto era estudiar el papel de los distintos dominios de una proteína politópica tan compleja como Chs3 en su tráfico intracelular hasta sus distintos destinos. Para abordar este objetivo se construyeron una serie de quimeras de la proteína que nos facilitarían el estudio por separado de cada una de estas regiones. Esperábamos así que cada una de las quimeras se bloquease en una etapa diferente de la ruta secretora de Chs3 para poder analizar en cada compartimento el tráfico de la proteína y determinar cuáles eran los dominios implicados en cada etapa. Sin embargo, los resultados preliminares obtenidos con estas quimeras no fueron los esperados, lo que nos llevó a replantearnos el trabajo en torno a los siguientes objetivos:

1. Estudiar el papel de los distintos dominios de la proteína politópica Chs3, así como de algunas de sus modificaciones postraduccionales en el control de calidad de la proteína en el RE.
2. Estudiar el papel de la formación del complejo Chs7-Chs3 en el control de calidad y en el tráfico intracelular de ambas proteínas, y cómo el ensamblaje de dicho complejo es monitorizado a lo largo de la ruta secretora.
3. Estudiar el papel de la oligomerización de Chs3 en el tráfico intracelular y el control de calidad de esta proteína a lo largo de la vía secretora.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I:

ESTUDIO DE LOS MECANISMOS
Y SEÑALES IMPLICADAS EN EL
CONTROL DE CALIDAD DE Chs3.

1. PROTEÍNAS QUIMÉRICAS. HERRAMIENTAS ALTERNATIVAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS POLITÓPICAS.

Las proteínas politópicas como Chs3 cuentan con gran número de dominios, lo que complica el estudio del papel de sus distintas regiones en el tráfico intracelular. Por ello decidimos llevar a cabo la construcción de toda una serie de proteínas quiméricas derivadas de Chs3 que nos permitían estudiar el papel de dichas regiones por separado.

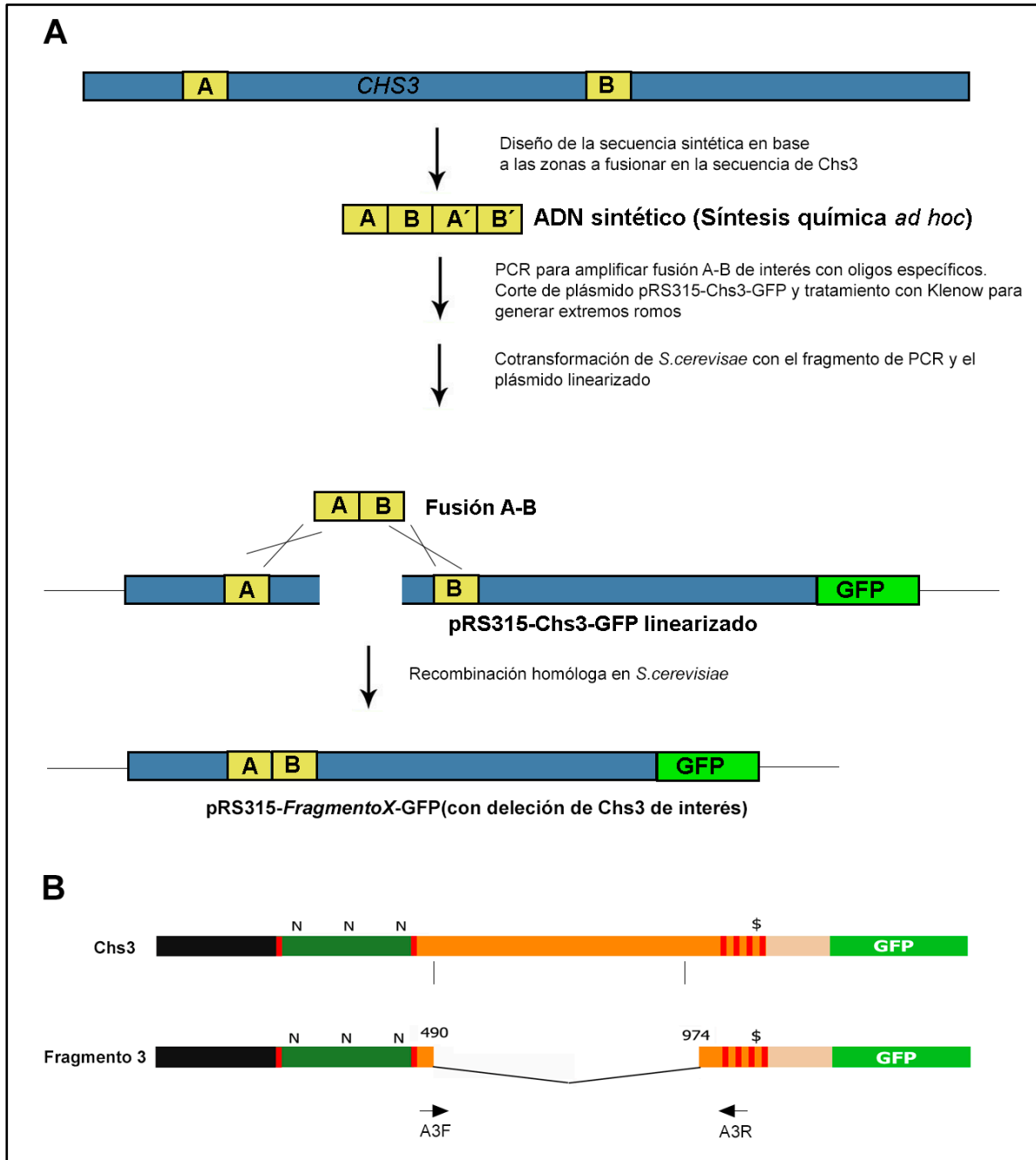


Figura 15. A) Esquema general para la construcción de las proteínas quiméricas de Chs3. B) Ejemplo de la construcción de la quimera Fragmento 3. A3F y A3R son los oligos Forward y Reverse usados en el caso de este fragmento.

La estrategia general seguida fue generar fragmentos de ADN sintéticos que recrearan la zona de la proteína a reconstruir y utilizar estos para reemplazar las regiones correspondientes de la proteína silvestre mediante recombinación homóloga *in vivo*. Para ello partimos de un ADN sintético (*GeneWiz*) que contenía las fusiones de secuencia adecuadas para construir nuestras quimeras en tándem. Posteriormente, y utilizando oligonucleótidos específicos para cada construcción y el ADN sintético como molde, amplificamos mediante PCR desde ese ADN sintético las fusiones de 120pb deseadas (60 pb iniciales para la región izquierda de la fusión más 60pb finales para la región derecha). Las fusiones obtenidas de la amplificación se separaron en un gel de agarosa y se purificaron las bandas de estas para eliminar posibles restos procedentes de la reacción de PCR. Una vez purificadas, estas fusiones se cotransformaron independientemente en el mutante *chs3Δ* junto a un plásmido pRS315 linearizado apropiadamente que contenía la ORF de Chs3 seguida de la GFP en su extremo C-terminal (Ver **Figura 15A** para los detalles). Los clones prototróficos para leucina que se recuperan en la transformación debían haber regenerado el plásmido mediante la recombinación entre las regiones homólogas de cada fusión y del gen *CHS3* contenido en el plásmido (**Figura 15A**).

Por último, se extrajo el ADN total de estas levaduras para su electroporación en *E.coli*, desde donde posteriormente se recuperaron los plásmidos de interés. La estructura de estos se comprobó mediante análisis de restricción y en el caso de que esta fuera correcta la construcción se verificó mediante secuenciación directa. El proceso en su conjunto se detalla en el esquema presentado en la **Figura 15**, mostrándose como ejemplo una de las quimeras construidas (**Figura 15B**). Los sitios de corte sobre el plásmido pRS315-Chs3-GFP y los oligonucleótidos utilizados para la construcción de cada una de las quimeras, así como su posición dentro de la secuencia de Chs3 se especifican en la parte 1 del Anexo (Anexo, **Figura A1** y Tabla 1).

2. ESTUDIO PRELIMINAR DEL TRÁFICO INTRACELULAR Y CONTROL DE CALIDAD DE LAS QUIMERAS DE Chs3.

Una vez construidas las distintas quimeras o Fragmentos (Fragmentos 1 a 7 de la **Figura 16**), se determinó la localización de cada una de ellas mediante microscopía de fluorescencia en un mutante nulo *chs3Δ* (**Figura 17**, columna 1). Además, se evaluó también su estabilidad mediante Western Blot (**Figura 18**).

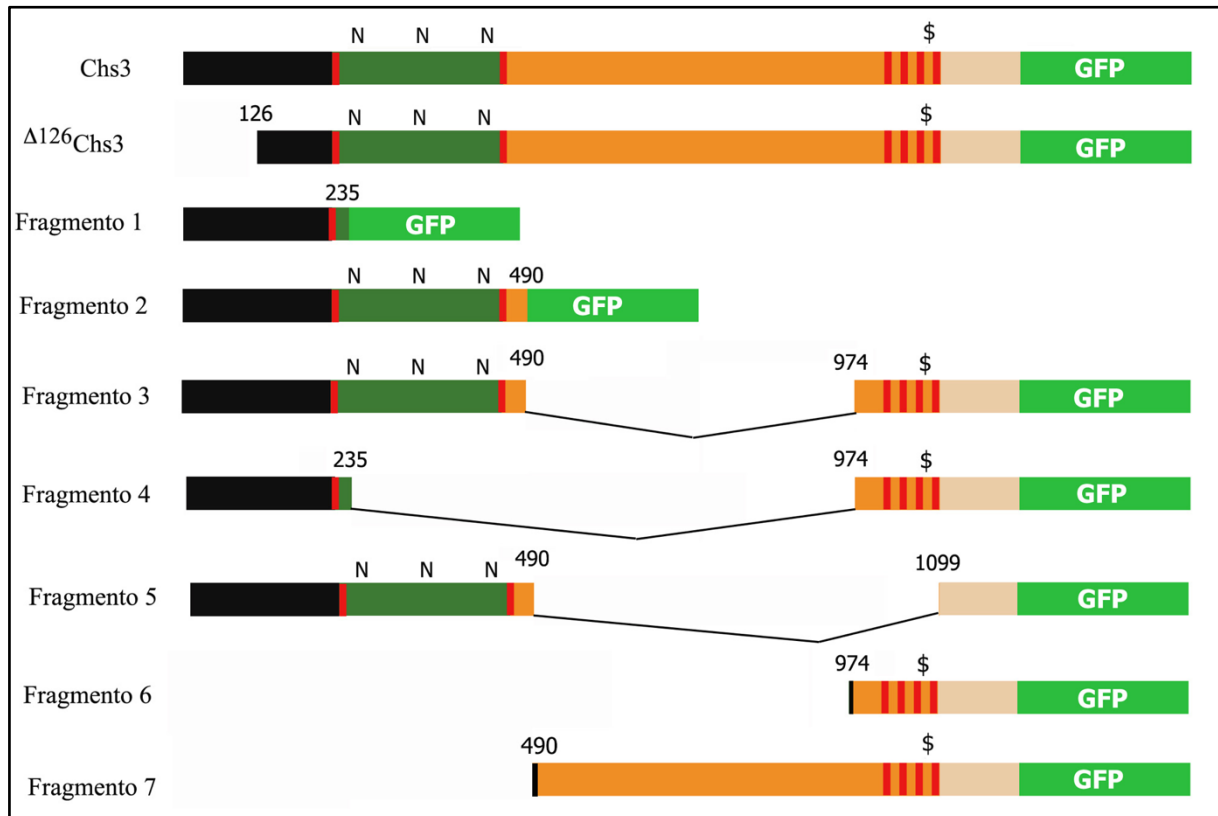


Figura 16. Topología de las quimeras construidas (Fragmentos 1-7), Chs3 y Δ^{126} Chs3.

Nuestro objetivo inicial era identificar quimeras que nos permitieran estudiar las distintas etapas del tráfico de Chs3 a lo largo de la vía secretora. Para ello esperábamos el bloqueo de las distintas quimeras en los distintos compartimentos a lo largo de su tránsito intracelular, para poder a partir de este estudiar las razones de cada bloqueo y analizar en detalle la maquinaria celular implicada en cada caso. Sin embargo, todas las quimeras, con la excepción del Fragmento 1 que se localizaba en puntos discretos, mostraron una clara localización en el RE y diferentes niveles de fluorescencia en citoplasma y núcleo (**Figura 17**, columna 1). Como control en el estudio se incluyó además de a la proteína completa Chs3 a la proteína Δ^{126} Chs3, previamente caracterizada en el laboratorio (**Figura 16**). Esta quimera presentaba problemas en su oligomerización, lo que provocaba su retención parcial en el RE a pesar de alcanzar la MP donde era funcional (Sacristan et al., 2013; **Figura 17**, columna 1).

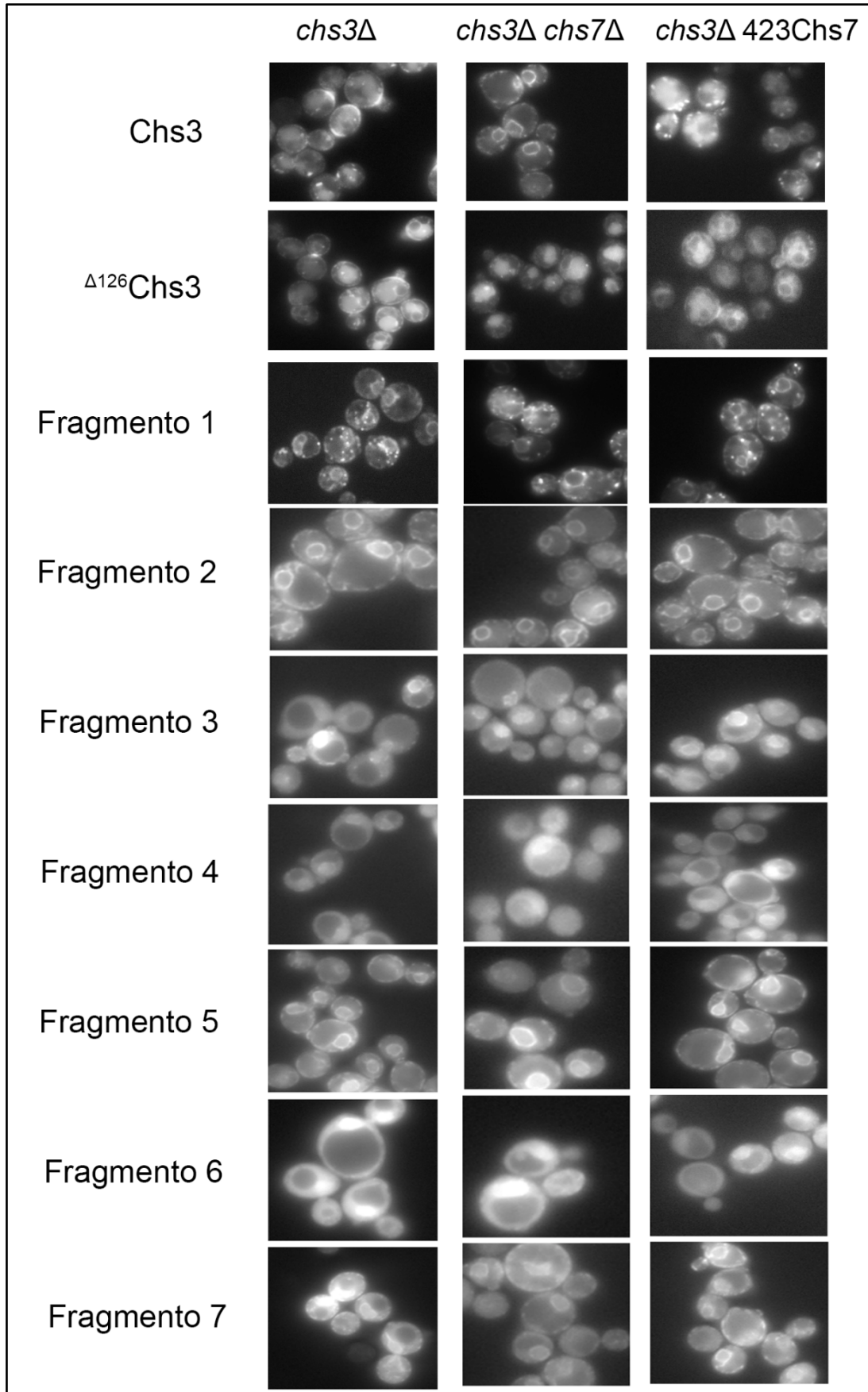


Figura 17. Localización de Chs3 y sus quimeras en cepas *CHS7/ chs7Δ /423CHS7 (chs3Δ)*. Todas estas proteínas están marcadas con GFP en su C-terminal (plásmidos pRS315).

En este estudio preliminar se decidió analizar también el efecto de la chaperona Chs7 en la localización de estas proteínas, para lo cual se verificó su localización en el mutante *chs7Δ* y en una cepa que sobreexpresaba el gen de la chaperona (*pRS423::CHS7*) (**Figura 17**, columnas 2 y 3). La proteína silvestre, Chs3-GFP, muestra una retención total en el RE en ausencia de su chaperona, mientras que la sobreexpresión de esta estimulaba en cierta medida la salida de Chs3 a la MP debido a que en condiciones normales Chs7 se encuentra en concentraciones limitantes (Trilla et al, 1999). Sorprendentemente, la quimera Δ^{126} Chs3-GFP no quedaba retenida en el RE en el mutante *chs7Δ* ya que era capaz de salir del RE alcanzando la vacuola, aunque aparentemente no llegaba a la MP puesto que no veíamos su localización en el cuello. La sobreexpresión de *CHS7* aliviaba la retención de la proteína Δ^{126} Chs3-GFP tal y como ya había sido descrito (Sacristán et al., 2013). Por otra parte, ni la delección ni la sobreexpresión de *CHS7* afectó significativamente a la localización de ninguna de las quimeras construidas.

La estabilidad de Chs3 y las distintas quimeras fue analizada mediante Western Blot en una cepa conteniendo niveles silvestres de *CHS7* (**Figura 18**). La proteína Δ^{126} Chs3-GFP se expresa a niveles similares a la silvestre, detectándose en ambos casos una banda tenue resultado del procesamiento de estas proteínas en la vacuola que se observa como la proteína GFP completa (28 kDa) (**Figura 18A**; GFP(V)). Teniendo en cuenta esto y sus diferentes características en cuanto a localización y efecto de Chs7, decidimos llevar a cabo un análisis por separado de esta construcción que se presentará en el capítulo II de Resultados.

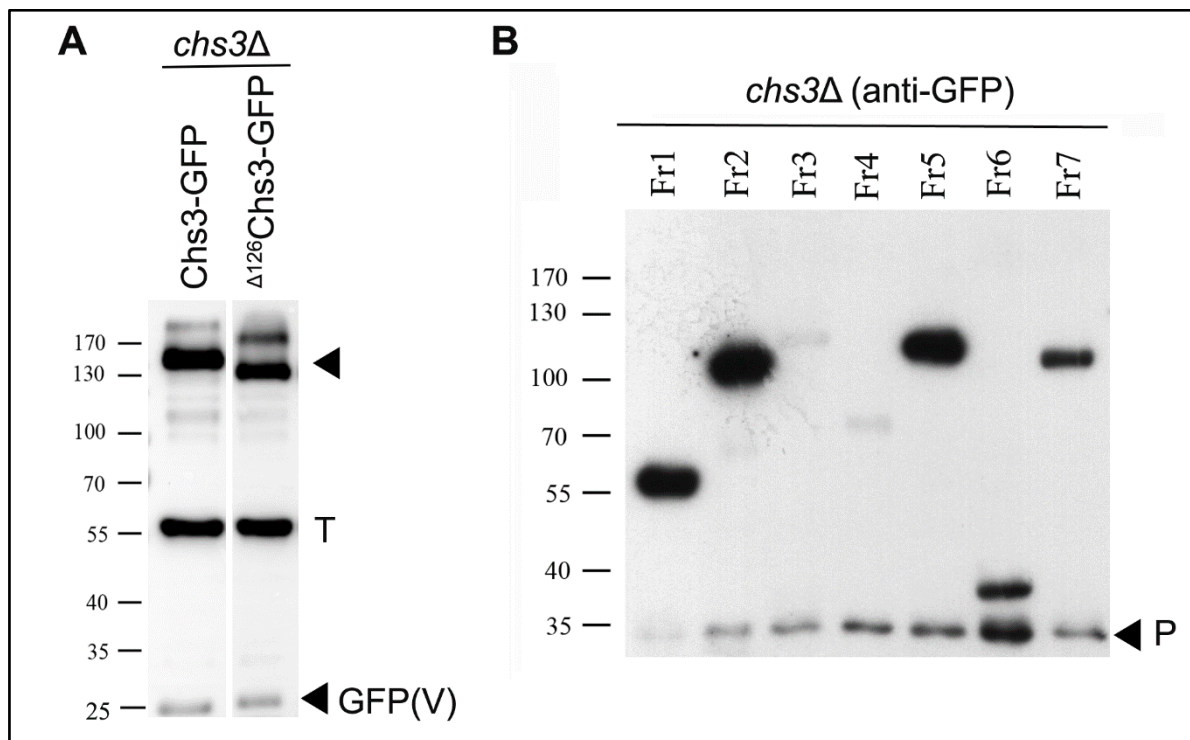


Figura 18. A) Western Blot de Chs3-GFP y la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en la cepa *chs3Δ*. B) Western Blot de cada uno de los fragmentos (marcados con GFP) en la cepa *chs3Δ*. P= banda de procesamiento proteasomal. GFP(V)= banda de GFP resistente a degradación vacuolar o banda de GFP libre (Recordar esta notación para el resto de figuras que se muestren).

Las quimeras construidas se detectaron a niveles muy diferentes (**Figura 18B**). Los Fragmentos 1, 2 y 5 se visualizaron con el tamaño esperado a altos niveles, lo que indicaría la estabilidad de estas proteínas. Los Fragmentos 6 y 7 presentaron niveles intermedios, mientras que los Fragmentos 3 y 4 apenas eran detectables. En todos los casos (salvo para el Fragmento 1) se detectó una banda de aproximadamente 35kDa que había sido previamente asociada con el procesamiento incompleto de proteínas por el proteasoma (Holmberg et al., 2004; Aviram & Kornitzer, 2010) (**Figura 18B**; P). De acuerdo con estos resultados y la localización de los Fragmentos 3, 4, 6 y 7 en el RE y el citoplasma/núcleo, esto podía ser un indicativo del reconocimiento de estas proteínas por los sistemas de ERAD/INMAD, lo que en último término conduciría a su degradación por el proteasoma 26S. La degradación mínima de los Fragmentos 2 y 5 concuerda con la nítida localización de estas proteínas en el RE, lo que indicaría un pobre reconocimiento de estos fragmentos por los sistemas de ERAD/INMAD, de forma similar a lo que ocurre con las proteínas Chs3 y Δ^{126} Chs3.

El Fragmento 1 presentaba características distintas con una localización punteada, probablemente asociada al RE, y sin aparente degradación proteasomal por lo que se analizará por separado (**Figuras 17 y 18B**).

Las proteínas Chs3 y Δ^{126} Chs3 son funcionales y por lo tanto restauran la síntesis de quitina y la sensibilidad al calcoflúor del mutante nulo *chs3* Δ . Sin embargo, ninguna de las proteínas quiméricas construidas resultó ser funcional ya que fueron incapaces de restaurar la síntesis de quitina en el mutante *chs3* Δ independientemente de los niveles de *CHS7* (resultados no mostrados).

A continuación, se presenta un análisis detallado del tráfico y QC de Chs3 que tiene como base el estudio con estas quimeras, estudio que posteriormente se ampliaría con la construcción de nuevas quimeras y mutantes. En primer lugar, y teniendo en cuenta los resultados iniciales que apuntaban a un papel de la ruta UPS, se realizó una búsqueda masiva con el objetivo de encontrar posibles factores de esta ruta implicados en la degradación de algunas de nuestras quimeras.

2.1. Búsqueda masiva para la identificación de dianas implicadas en la degradación de las quimeras de Chs3.

Para confirmar nuestra hipótesis de partida e identificar posibles factores de la ruta UPS que podrían estar implicados en la degradación de nuestras quimeras, decidimos llevar a cabo una búsqueda masiva usando la metodología SGA (Synthetic Genetic Array) (Baryshnikova et al., 2010; ver Materiales y Métodos) y una nueva aproximación basada en el marcaje de proteínas con *timers* fluorescentes en tándem (tFTs= “*timer fluorescent timers*”) (Khmelniskii et al., 2012). Esta aproximación nos permite cuantificar la abundancia y la estabilidad de nuestra proteína cuando la marcamos con un tándem constituido por 2 proteínas fluorescentes cada una de las cuales presenta un tiempo de maduración distinto (Khmelniskii et al., 2012; Khmelniskii & Knop, 2014; **Figura 19**). En este caso se utilizó el tándem mCherry-SuperfolderGFP. El fluoróforo de maduración lenta (mCherry) madura con una cinética mucho más lenta que la del de maduración rápida (SfGFP), lo que hace que medidas de las ratios de intensidad mCherry/SfGFP constituyan una medida de la estabilidad de la proteína, de manera que cuanto mayor sea la ratio (rojo/verde) mayor será la estabilidad

de la proteína (**Figura 19A**). Adicionalmente, la medida de la propia intensidad de la SfGFP nos serviría como indicador de la abundancia de nuestra proteína marcada.

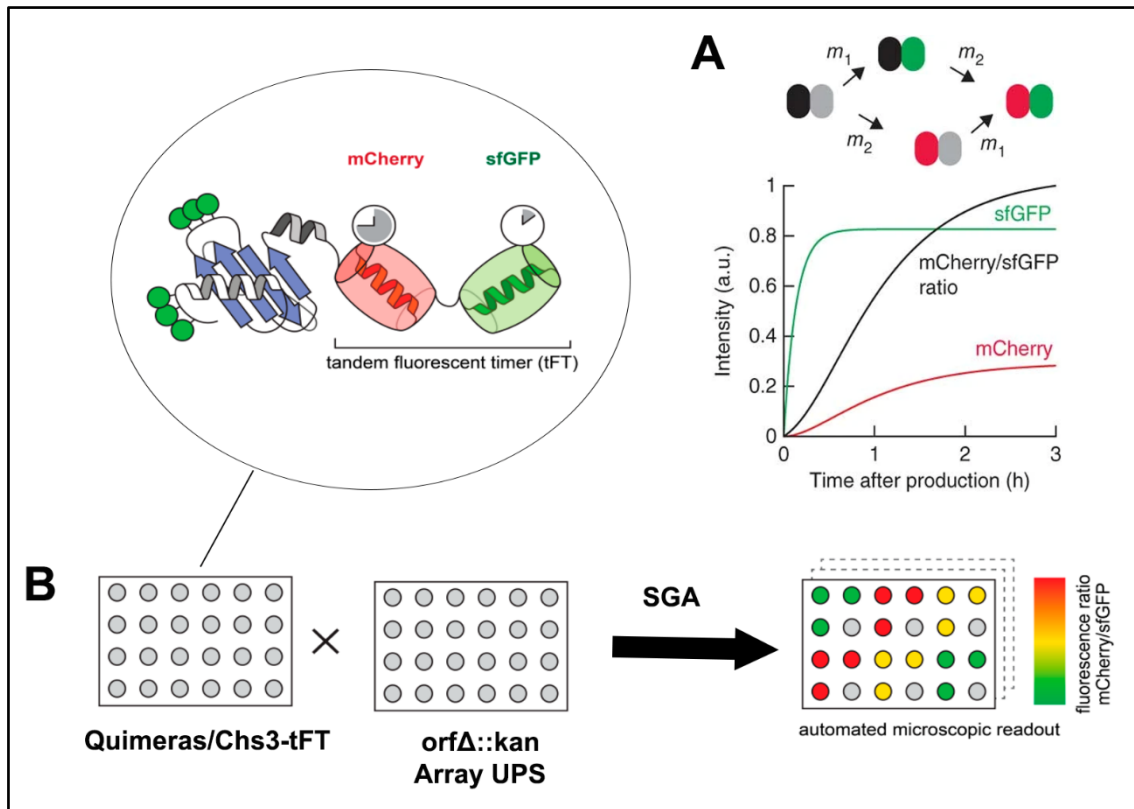


Figura 19. A) Evolución de la ratio de intensidades mCherry/SfGFP con el tiempo. B) Esquema de realización de la búsqueda masiva (ver Materiales y Métodos para detalles).

Teniendo en cuenta esto, se marcaron en el genoma con el tándem fluorescente la proteína Chs3 y los Fragmentos 2, 3a y 7 en la cepa de fondo genético Y8205. El Fragmento 3a cuya estructura se presenta en la **Figura 20** fue construido posteriormente a los fragmentos iniciales y se utilizó en este análisis. Una vez construidas cada una de las cepas con su correspondiente proteína marcada con el tándem, estas se cruzaron con una librería que contenía todos los mutantes de la UPS (E2s, E3s, subunidades proteasomales, etc) y algunos mutantes implicados en otros procesos como la autofagia (**Figura 19B**) (Kong et al., 2021). Siguiendo la metodología SGA, y de forma automatizada, se transferían las colonias de unos medios a otros (en base a los distintos pasos de selección y a los marcadores presentes en las cepas que queríamos seleccionar en cada caso) hasta al final obtener los correspondientes mutantes haploides que contenían nuestra proteína marcada con el tándem y la delección correspondiente a cada gen de la librería (Ver Materiales y Métodos para los detalles técnicos). En las placas finales se median las intensidades de mCherry y SfGFP de las colonias y a partir de estas se hacían los cálculos correspondientes. En la **Figura 20** se muestran los z-scores de las ratios de intensidad mCherry/SfGFP para un p-valor < 0.05. Con este p-valor para una distribución normal, los valores de los Z críticos son -1,96 por la izquierda y +1,96 por la derecha. De esta manera un z-score para un mutante mayor que +1,96 indicaría que en ese mutante la proteína es significativamente más estable que lo que lo es en la

población general asumiendo un error del 5%. Z-scores menores que -1,96 indicarían que en el mutante esa proteína es significativamente menos estable que lo que lo es en la población general (asumiendo un error del 5%). Z-scores entre -1,96 y 1,96 indicarían que no se pueden asumir diferencias de estabilidad asumiendo ese valor de error (aunque un valor $Z > 1$ indicaría una mayor estabilidad y un $Z < 1$ una menor estabilidad). Además, cuanto mayor sea el valor absoluto del z-score mayor será la diferencia en estabilidad.

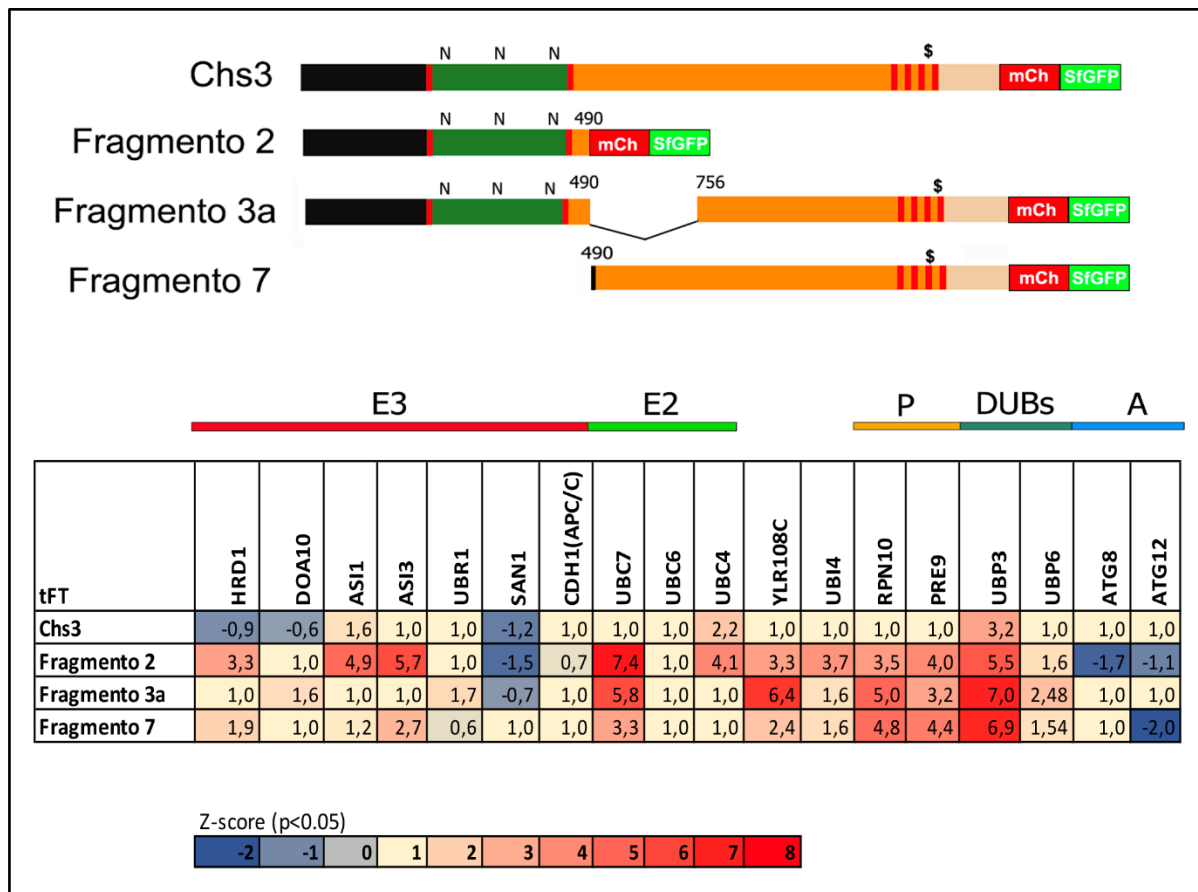


Figura 20. Z-scores de las ratios de intensidad mCherry/SfGFP (p -valor<0.05) para Chs3 y los Fragmentos 2, 3a y 7 marcados con el tándem. E3= Genes de E3s ubiquitina ligasas. E2= Genes de enzimas E2 conjugadoras de ubiquitina. P= Genes de subunidades proteasomales. DUBs: Genes de desubiquitininas. A= Genes de proteínas implicadas en autofagia.

Las conclusiones preliminares que se pueden deducir de esta búsqueda son las siguientes:

1. Los Fragmentos 2, 3a y 7 se estabilizan considerablemente en los mutantes para genes del proteasoma (*RPN10*, *PRE9*), cosa que no ocurre para la proteína silvestre Chs3 que puede servir como un control en este análisis, puesto que hasta donde sabemos Chs3 no parece sustrato del proteasoma en condiciones normales.
2. Ni Chs3 ni ninguno de los fragmentos se degradan por macroautofagia siendo igual de estables en los mutantes de los genes *ATG8* y *ATG12*.

3. Los Fragmentos 2, 3a y 7 son sustratos claros de ERAD/INMAD. En el caso del Fragmento 2 el papel principal en la degradación parece tenerlo el complejo E3 de INMAD Asi (*ASI1* y *ASI3*) y las E2s Ubc7 y Ubc4. En el Fragmento 3a la implicación de las E3 canónicas de ERAD no está tan clara con z-scores menores a 1,96, aunque se intuye un papel de ERAD-C en la degradación de esta construcción al estabilizarse parcialmente la proteína en los mutantes de los genes *DOA10*, *UBR1* y *UBP6*. Por último, el Fragmento 7 presenta una estabilización en los mutantes de los genes *ASI3* y *HRD1*, lo que sugería la implicación de los complejos Asi y Hrd1 en su degradación. Tanto el Fragmento 3a como el 7 se estabilizan fuertemente en el mutante *ubc7Δ*, lo que apuntaba a que la E2 Ubc7 era la principal implicada en su degradación colaborando con las correspondientes E3s. En este punto también es importante señalar que el complejo E3 APC/C (activador *CDH1* en la librería) y la E3 ubiquitina ligasa San1 no parecían tener papel alguno en la degradación de nuestras quimeras, lo cual concordaba con lo esperado puesto que tanto APC/C como San1 participan fundamentalmente en el control de calidad de proteínas nucleares y citosólicas solubles.
4. Todas las quimeras se estabilizan considerablemente en el mutante de la ORF *YLR108C*. *YLR108C* es una ORF de función desconocida. Su proteína tiene una localización nucleoplásmica y se ha descrito una interacción negativa de esta ORF con *ASI2* (Constanzo et al., 2016). Esto, unido al hecho de que presenta un dominio de interacción proteína-proteína BTZ/POZ presente típicamente en factores de transcripción y ciertas E3 ligasas, nos lleva a pensar que esta ORF podría estar implicada en el control de calidad nuclear.
5. Todas las proteínas analizadas, incluyendo la proteína silvestre Chs3, presentan también una estabilización considerable en el mutante del gen *UBP3*. Ubp3 es una desubiquitinasa con múltiples funciones. Entre estas se encuentran la regulación del tráfico RE-Golgi (Cohen et al., 2003) donde desubiquitina a subunidades de los complejos COPII y COPI previniendo su degradación y, más recientemente, se ha descrito su papel en ERAD-L y en degradación de proteínas citosólicas (Fang et al., 2016; Wu et al., 2020). Adicionalmente, trabajo previo en el laboratorio (C. Antón, no publicado) sugería que la mutación del gen *UBP3* era capaz de revertir el fenotipo del mutante del exómero permitiendo la llegada de Chs3 a la MP. Todas estas evidencias hacen que la interpretación de este resultado se haga compleja pudiendo actuar esta proteína a múltiples niveles del tráfico o QC de Chs3 y nuestras quimeras.

De todo lo anterior se infiere que, a diferencia de la proteína WT, las quimeras de Chs3 deben encontrarse desplegadas en el RE, lo que explicaría tanto la pérdida de funcionalidad observada como su reconocimiento por los sistemas de ERAD/INMAD para su degradación por el proteasoma 26S.

3. ANÁLISIS DEL QC DE Chs3.

Teniendo como referencia las conclusiones preliminares de la búsqueda masiva, nos propusimos llevar a cabo un estudio de cada una de las regiones de la proteína usando las quimeras construidas y mutantes adicionales con el objetivo de tratar de establecer un modelo para definir los determinantes estructurales y las señales presentes en Chs3 que regulan su QC en el RE.

Si tenemos en cuenta que Chs3 es una proteína politópica, una de las regiones que podía estar regulando el plegamiento de la proteína en el RE era la conformada por sus dominios TM. Con esta premisa, el primer objetivo que nos planteamos fue analizar el papel de estos dominios TM y de las regiones que los delimitaban y que podían, por lo tanto, estar afectando a su plegamiento/inserción en la membrana.

Un segundo objetivo fue examinar la posible implicación de distintas modificaciones postraduccionales presentes en Chs3 en su QC. En este punto nos propusimos analizar el papel de la palmitoilación en el QC de Chs3, más allá del previamente descrito en la salida del RE de la proteína (Lam et al., 2006). La palmitoilación de proteínas parece ejercer su acción afectando a la organización de los dominios TM en la membrana por lo que una proteína politópica como Chs3 se presentaba como un modelo excelente para estudiar el papel de esta modificación postraducciona. Por otro lado, y aunque trabajo previo había descartado el papel de la N-glicosilación de Chs3 en el tráfico y función de la proteína (Sacristan et al., 2013), nos propusimos revisar más fondo la posible implicación de esta modificación en el QC de Chs3 ya que esta había demostrado ser relevante para el QC de numerosas proteínas en el RE. Dado que los sitios de N-glicosilación de la proteína se localizan en su dominio luminal, dentro de este objetivo se incluye también el análisis del papel de este dominio en el tráfico y QC de Chs3.

Por último, expondremos los resultados obtenidos de los experimentos con el Fragmento 1 que, como ya hemos comentado, presentaba características distintas a las del resto de fragmentos.

3.1. ESTUDIO DEL PAPEL DE LOS DISTINTOS DOMINIOS DE Chs3 EN SU CONTROL DE CALIDAD.

A continuación, se presenta el estudio del QC llevado a cabo sobre las quimeras que se localizaban en el RE, el citoplasma y/o el núcleo y parecían estar sometidas a un procesamiento proteasomal. Estas quimeras, cada una de las cuales presenta distintas características en lo que se refiere a sus distintos dominios y al número de hélices TM, nos permitían analizar por separado el papel de las distintas regiones de una proteína tan compleja como Chs3.

3.1.1. Análisis del N-terminal de Chs3. El Fragmento 2.

El Fragmento 2 (Fr2) incluye la región N-terminal, el dominio luminal y las dos hélices transmembrana iniciales de Chs3 (**Figura 21**). La banda de procesamiento proteasomal del Fr2 era bastante tenue y su localización en el RE, clara y sin apenas señal citoplásmica, sugería que la proteína no se degradaba o lo hacía en una cantidad ínfima (**Figuras 17 y 18B**); sin embargo, los resultados de la búsqueda masiva apuntaban a la implicación del complejo Asi y/o de Hrd1 en la degradación de esta quimera. Decidimos por lo tanto hacer cinéticas de degradación del Fr2 en presencia de cicloheximida en la cepa control (*chs3Δ*) y en distintos mutantes de ERAD/INMAD. Estos experimentos revelaron que el Fr2 es un sustrato del complejo Asi al observar una estabilización de la quimera en el mutante *chs3Δ asi1Δ* con respecto a la cepa control *chs3Δ* (**Figura 21**). La cinética de degradación era bastante lenta, lo que concordaba con la tenue banda de degradación proteasomal observada para este fragmento. El complejo Asi reconoce a sus sustratos a través de señales en los dominios TM de estos. Puesto que el Fr2 no es funcional y solo cuenta con los 2 dominios TM iniciales de la proteína, esto nos sugiere que estos dominios deben encontrarse desplegados siendo reconocidos por el complejo Asi en la MNI a donde estaría accediendo por difusión desde la membrana del RE. Estos datos están de acuerdo con lo obtenido en la búsqueda masiva donde los z-scores de las ratios más altos eran para genes de este complejo (*ASI1*, *ASI3*). Sin embargo, no observamos una estabilización del Fr2 ni en el mutante *hrd1Δ* ni el mutante *ylr108cΔ*, lo que contradecía parte de los resultados de dicha búsqueda (resultados no mostrados).

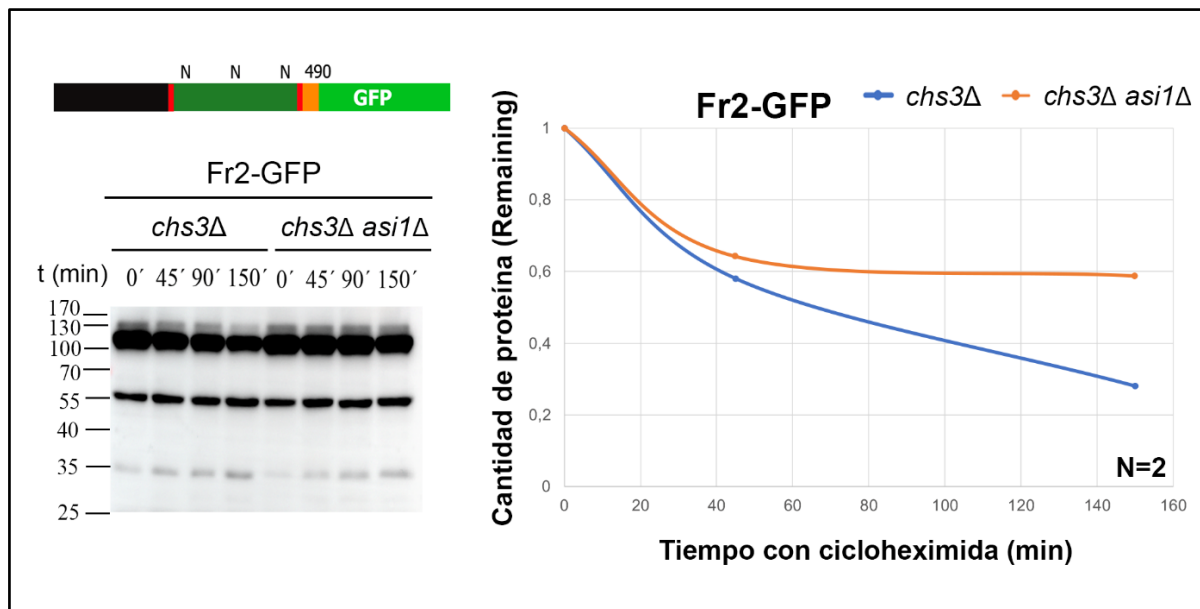


Figura 21. Estructura y cinética con cicloheximida del Fragmento2-GFP en los mutantes *chs3Δ* y *chs3Δ asi1Δ*. La cantidad de proteína que queda con el paso del tiempo tras el tratamiento con cicloheximida (*Remaining*) se expresa en tantos por 1.

3.1.2. Análisis de los dominios citosólicos central y C-terminal de Chs3.

Para este análisis se utilizaron los Fragmentos 3 y 7 diseñados inicialmente, así como toda una serie de fragmentos adicionales que se construyeron en un segundo momento (usando la misma metodología ya descrita, Ver Anexo) para extender el estudio.

El Fragmento 3 y sus quimeras derivadas (Fragmentos 3a, 3b y 8) presentaban deleciones de distinto tamaño en el dominio citosólico central de la proteína preservando el resto de los dominios completos (**Figura 22A**). Tras llevar a cabo distintos experimentos de Western Blot para detectar proteína total, y cinéticas con cicloheximida para evaluar su estabilidad en el tiempo, llegamos a la conclusión de que todos estos fragmentos se estabilizaban fundamentalmente en los mutantes de los complejos Doa10 y Asi (**Figura 22D**), indicativo de que estas quimeras eran tanto sustrato de ERAD-C (Doa10) como de ERAD-M (Asi) siendo reconocidas por dichos complejos. Aquí mostramos solo los datos de las cinéticas para el Fragmento 3a (Fr3a), extensibles para el resto. En este análisis incluimos a los mutantes en todas las E3s u ORFs como *YLR108C* que parecían estar implicadas en la degradación del Fr3a de acuerdo con los datos preliminares obtenidos en la búsqueda masiva.

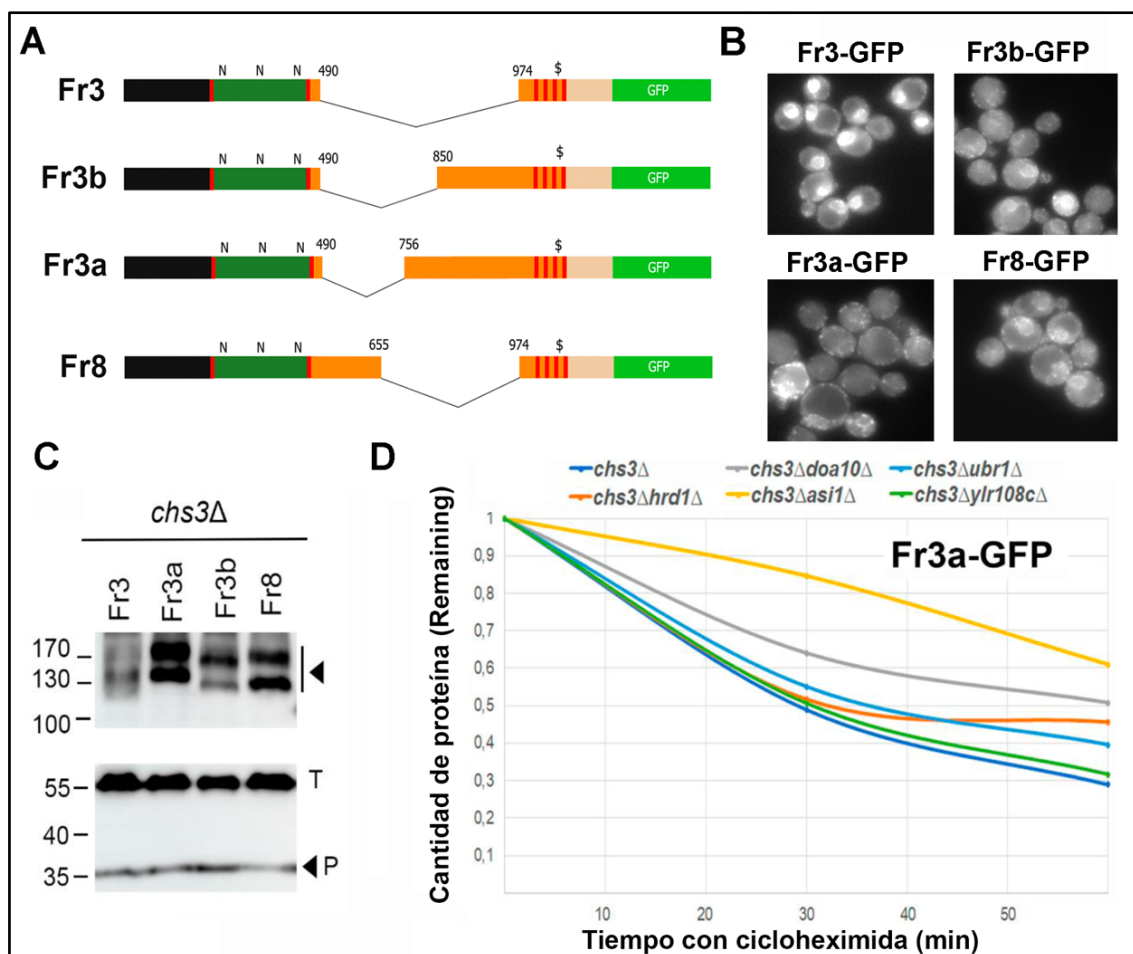


Figura 22. A) Topología de Fr3-GFP, Fr3a-GFP, Fr3b-GFP y Fr8-GFP. B) Localización de fragmentos de A en un mutante *chs3Δ*. C) Western Blot de Fr3-GFP, Fr3a-GFP, Fr3b-GFP y Fr8-GFP en un mutante *chs3Δ*. D) Cinética de degradación en distintos mutantes de ERAD/INMAD y la cepa control *chs3Δ* para el Fr3a-GFP (extensible para el resto).

Como el complejo Asi reconocía a todas estas quimeras y este complejo E3 reconoce a sus sustratos a través de dominios TM, la región conteniendo los 4 últimos dominios TM presente en todas estas quimeras parecía constituir un degrón típico de ERAD-M. Por otro lado, el hecho de que el complejo E3 Doa10 reconozca normalmente señales desplegadas orientadas hacia el citosol y todas estas quimeras sean su sustrato y compartan un dominio citosólico central más o menos extenso, apunta claramente a esta región citosólica central como un degrón de ERAD-C. Estas dos deducciones son asimismo consecuentes con el hecho de que justamente el Fr7 que es la quimera con el dominio citosólico más grande fuese fundamentalmente reconocida por Doa10 y de forma minoritaria por Asi, ocurriendo lo contrario con el resto de quimeras que presentaban grandes deleciones en esta región.

Otro resultado interesante, obtenido al comparar los niveles de proteína entre las diferentes quimeras de los Fragmentos 3 y 7, fue observar como a medida que se acortaba el dominio citosólico central la cantidad de proteína total disminuía (**Figura 22C; Figura 23B**), indicativo de una mayor degradación de la misma. Esto también se infería de las diferencias observadas en la tinción citoplásmica/nuclear entre las distintas quimeras a nivel microscópico (**Figura 22B; Figura 23A**). Este resultado sugería que la longitud de esta región citosólica era un determinante importante para el reconocimiento de la proteína por los sistemas de ERAD/INMAD.

3.2. ANÁLISIS DEL PAPEL DE LA PALMITOILACIÓN SOBRE EL TRÁFICO Y EL QC DE Chs3.

Trabajo previo sobre la palmitoilación de Chs3 había demostrado que Pfa4 palmitoila a Chs3 y que esta modificación postraduccional era esencial para prevenir su agregación en el RE (Lam et al., 2006), donde la proteína se acumulaba al ser reconocida como no palmitoilada en el cis-Golgi y devuelta de forma continua al RE en vesículas COPI (Lam Thesis, 2009). La deleción de los genes *BRE5* y/o *UBP3* suprimía el fenotipo del mutante de palmitoilación permitiendo a la proteína alcanzar la MP donde era capaz, aun sin estar palmitoilada, de llevar a cabo su función. Lam (2009) había propuesto la existencia de dos sitios de palmitoilación en Chs3 localizados en las cisteínas 1014 y 1018 que estarían situadas hacia el citosol justo antes del quinto dominio TM de acuerdo con las predicciones (Ver **Figura 14**), por lo que eliminamos estos sitios en la proteína para analizar cómo afectaba esta modificación al tráfico y QC de la proteína. Complementariamente se marcó al mutante de palmitoilación con el tándem fluorescente mCherry-SfGFP y se incluyó la correspondiente cepa marcada en el análisis comentado previamente.

Los datos obtenidos en dicho análisis apuntaban a que Chs3^{C1014/1018A}-tFT no se estabilizaba en mutantes para los genes del proteasoma (*PRE9* y *RPN10*), aunque sí que lo hacía en los mutantes en los genes de ERAD *HRD1* y *UBC7* y en el gen de la desubiquitinasa asociada al proteasoma *UBP6* (**Figura 24A**). Ante estos resultados, en parte contradictorios, decidimos llevar a cabo experimentos de Western Blot para determinar de forma definitiva si había o no un papel del sistema ERAD/INMAD sobre la degradación del mutante de palmitoilación. Los resultados de estos experimentos muestran como la ausencia de Hrd1 o Asi genera un incremento en el nivel de proteína (**Figura 24B**). Sin embargo, Hrd1 y Asi no reconocen normalmente degrones citosólicos, lo que nos lleva a pensar que eliminar la

palmitoilación de estos sitios estaría afectando a la integración de la proteína en la membrana, seguramente originando algún tipo de degrón en la zona de los dominios TM proximales a esta modificación en Chs3 (ERAD-M). Puesto que Hrd1 y Asi participan en ERAD-M y en este caso Hrd1 no podría llevar a cabo ERAD-L ya que no hay degrón del lado luminal, todo apunta a que el mutante de palmitoilación de Chs3 es un sustrato de ERAD-M.

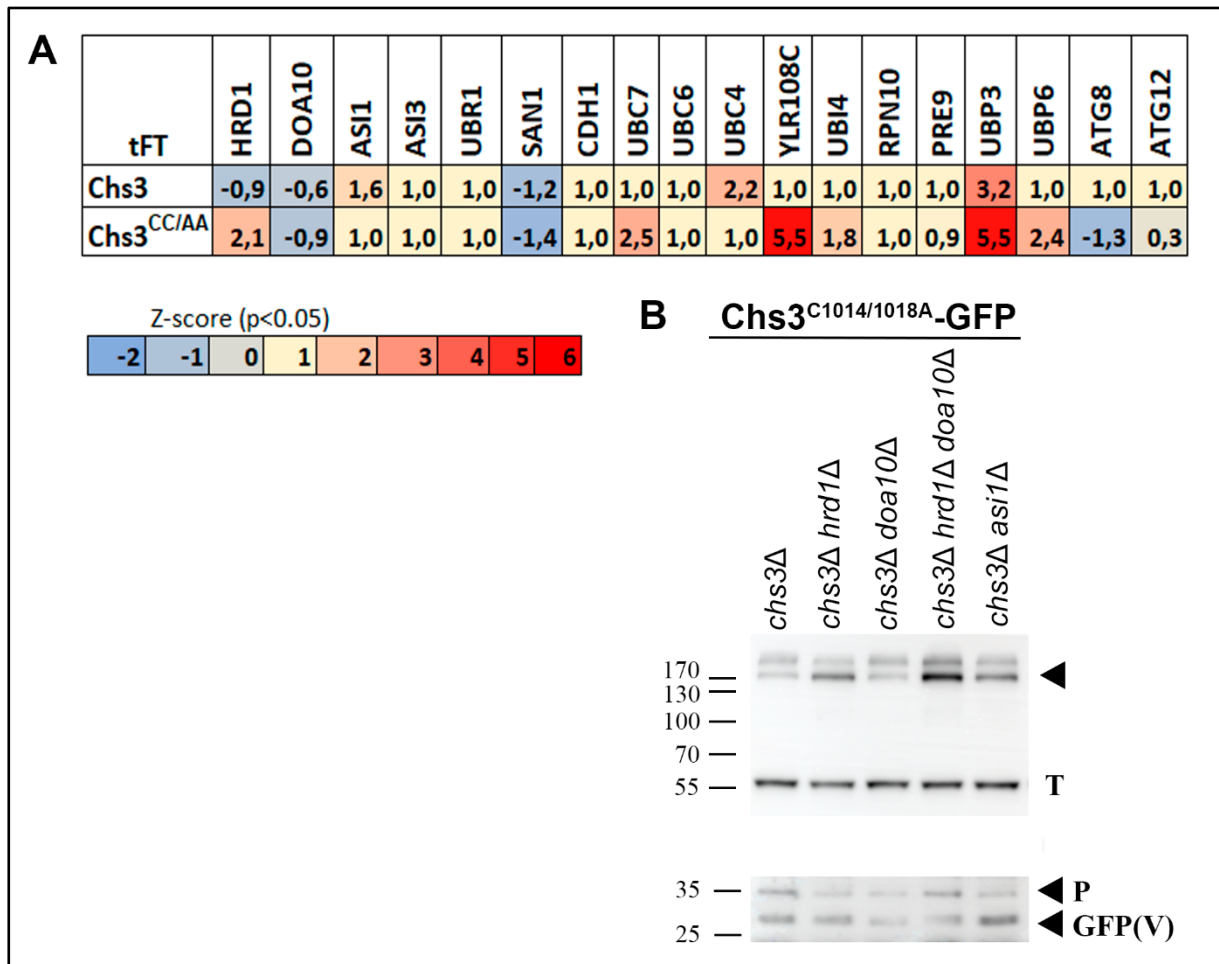


Figura 24. A) Z-scores (p<0.05) de las ratios de intensidad mCherry/SfGFP para Chs3-tFT y el mutante Chs3^{C1014/1018A}-tFT en una cepa WT. B) Nivel de proteína/Procesamiento de Chs3^{C1014/1018A}-GFP en la cepa control *chs3Δ* y en distintos mutantes de ERAD/INMAD. T=Tubulina.

La estabilización observada en el mutante *ubp3Δ* podía explicarse por la recuperación de la vía de tráfico de Chs3^{C1014/1018A}, ya descrita, que se daba en este mutante (Lam Thesis, 2009; **Figura 25A**), lo que estaría evitando la acumulación en el RE de la proteína reduciéndose como consecuencia su acceso a ERAD/INMAD. Esto también se deducía de los resultados de los experimentos de Western Blot donde se apreciaba como en el mutante *chs3Δ ubp3Δ* la intensidad de la banda de degradación proteasomal se atenuaba en favor de un aumento del procesamiento de la proteína en la vacuola (**Figura 25B**; P frente a GFP), consecuencia de la apertura de su vía de tráfico a la MP desde donde se endocitaría para ser degradada por la ruta del MVB de la misma manera que lo hace la proteína silvestre en condiciones WT (Arcones et al., 2016).

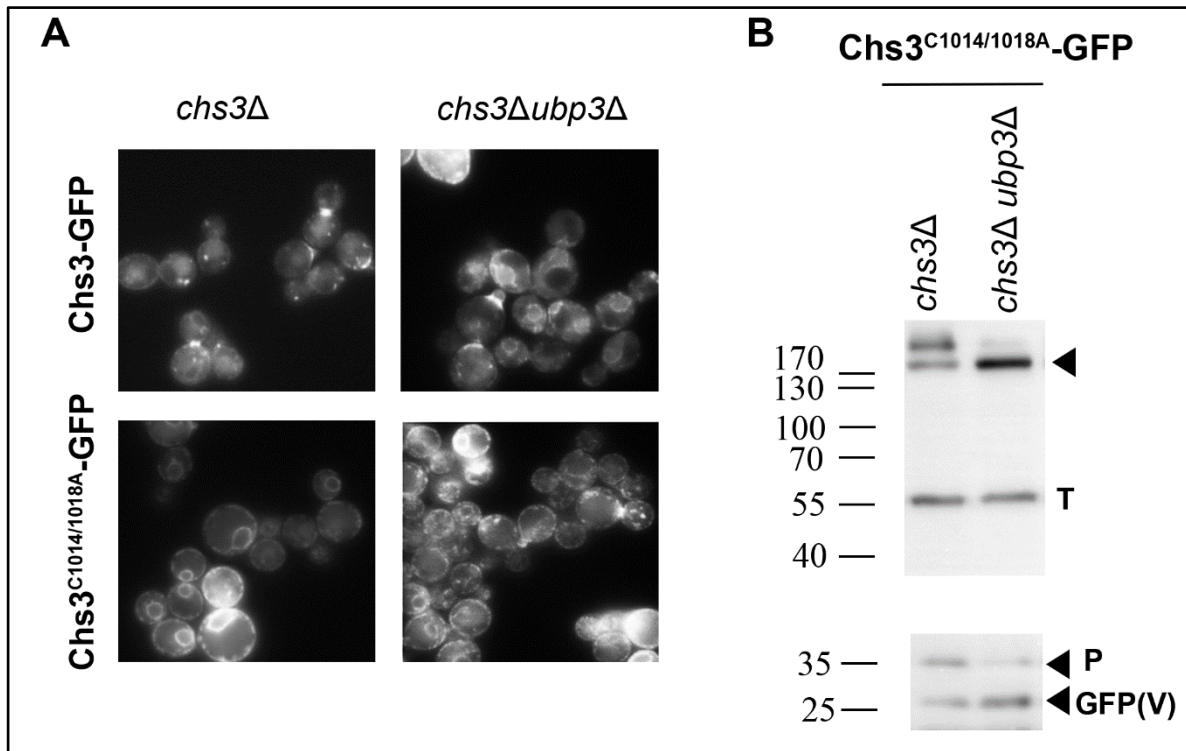


Figura 25. A) Localización de Chs3-GFP y Chs3^{C1014/1018A}-GFP en las cepas *chs3Δ* y *chs3Δ ubp3Δ*. B) Nivel de proteína/ procesamiento de la proteína Chs3^{C1014/1018A}-GFP en las cepas *chs3Δ* y *chs3Δ ubp3Δ*. T=Tubulina.

3.3. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA N-GLICOSILACIÓN DE Chs3 SOBRE SU CONTROL DE CALIDAD.

Como se ha comentado en la introducción, la N-glicosilación constituye una de las señales esenciales para el ERQC de glicoproteínas, de manera que ante defectos en su plegamiento estas son reconocidas por el sistema ERAD donde Hrd1 se encarga de su ubiquitinación, lo que lleva a su degradación definitiva por el proteasoma citosólico.

Chs3 presenta tres sitios susceptibles de N-glicosilación en sus asparaginas 303, 332 y 371 (Cos et al., 1998; Zielinska et al., 2012; Sacristan et al., 2013) situadas en el dominio luminal de la proteína. Aunque trabajo previo con los mutantes de N-glicosilación de Chs3 descartaba un papel relevante de esta modificación postraduccional en la función y localización de la proteína (Sacristan et al., 2013), decidimos analizar más a fondo qué ocurría utilizando en este caso el Fragmento 2 que contaba con este dominio glicosilado, pero carecía de las regiones central y C-terminal de la proteína, lo que facilitaba la interpretación de resultados y nos servía como un modelo de partida para estudiar posteriormente el papel de esta modificación sobre el tráfico y el QC de la proteína completa.

3.3.1. El Fragmento 2 como modelo de estudio de la N-glicosilación de Chs3.

Gracias a su pequeño tamaño, a la presencia del dominio luminal de Chs3 y a su retención total en el RE (sin necesidad de recurrir al mutante *chs7Δ*; **Figura 26A**), el Fragmento 2 (Fr2) se presentaba como un excelente modelo preliminar para estudiar el papel de la N-glicosilación sobre el tráfico y QC de Chs3. Para ello lo que hicimos fue trabajar con un mutante de este fragmento en donde los 3 sitios susceptibles de N-glicosilación en Chs3 se habían sustituido por residuos de glutamina, mutante al que denominamos Fr2^{QQQ}.

Una vez construido, se analizó si había diferencias en la localización y/o cantidad de proteína entre la versión glicosilada y la no glicosilada de este fragmento. En la **Figura 26A** se observa como el Fr2^{QQQ}-GFP presenta un ligero aumento en la tinción citoplásmica con respecto a su versión glicosilada. Además, dicho mutante de N-glicosilación mostraba sistemáticamente una menor cantidad de proteína de acuerdo con el Western Blot (**Figura 26B**). Igualmente, la realización de cinéticas con cicloheximida revelaba una cinética de degradación mucho más rápida del Fr2^{QQQ}-GFP con una vida media de 26 minutos frente a los 97.7 minutos de su versión glicosilada (**Figura 26C**).

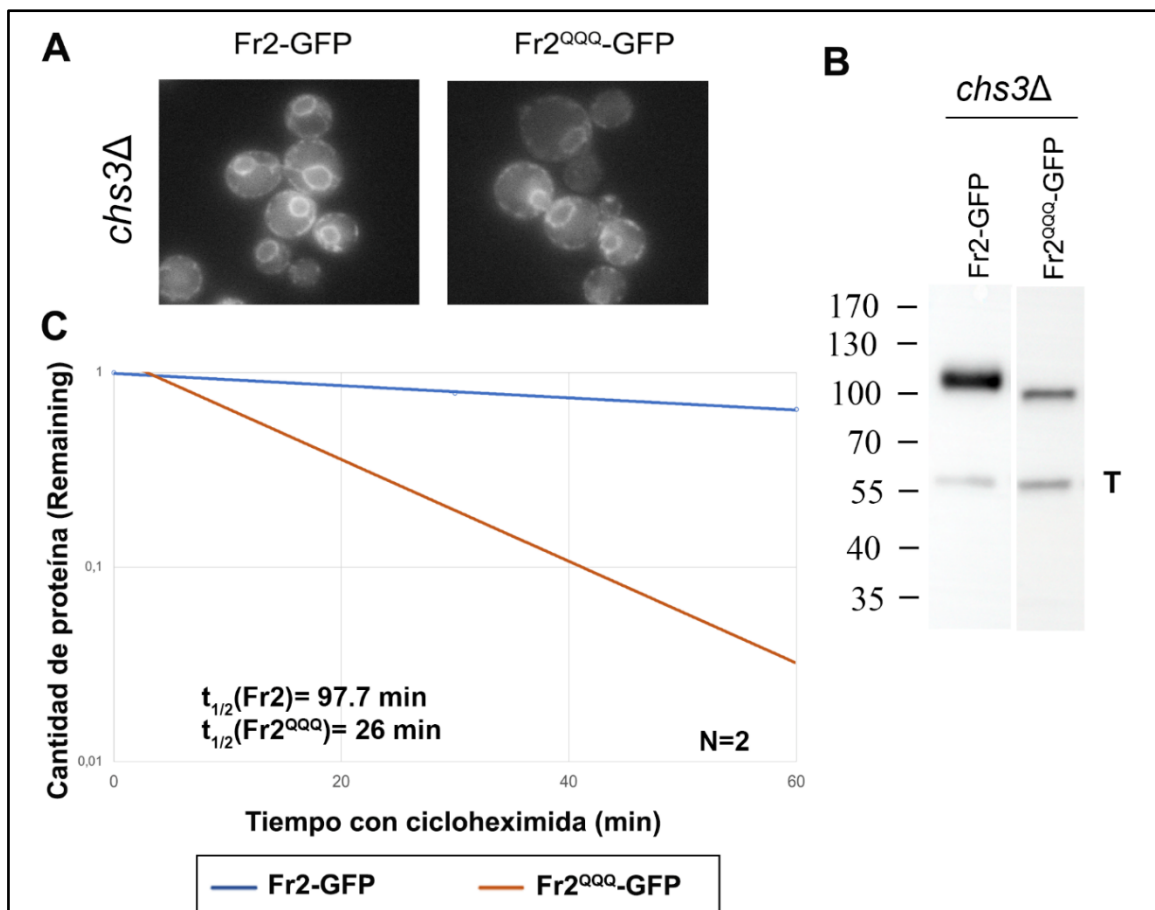


Figura 26. A) Localización de Fr2-GFP y Fr2^{QQQ}-GFP en un mutante *chs3Δ*. B) Western Blot de Fr2-GFP y Fr2^{QQQ}-GFP en un mutante *chs3Δ*. C) Líneas de ajuste exponencial de los datos de cinéticas con cicloheximida para Fr2-GFP y Fr2^{QQQ}-GFP en un mutante *chs3Δ*. El eje Y se encuentra en escala logarítmica y se señala la vida media ($t_{1/2}$) en cada caso, estimada a partir de la ecuación obtenida del ajuste. T=Tubulina.

La localización observada en el RE/citoplasma del Fr2^{QQQ}-GFP, unida a la menor cantidad de esta proteína que se degradaba además mucho más rápido que el Fr2-GFP, sugería que el Fr2^{QQQ}-GFP podría estar siendo reconocido por ERAD/INMAD y dirigido en parte a la degradación por el proteasoma. Para comprobar si era esto lo que ocurría llevamos a cabo experimentos de inhibición del proteasoma con el inhibidor del proteasoma MG-132. En estos experimentos se añadía al cultivo el inhibidor MG-132 o el tratamiento control (DMSO) para posteriormente parar la síntesis de proteínas con cicloheximida y recoger muestra a distintos tiempos (Ver Materiales y Métodos). Realizados en la cepa control *chs3Δ*, en ellos observábamos como el tratamiento con el inhibidor MG-132 ralentizaba la degradación del Fr2^{QQQ}-GFP con respecto a la observada en las condiciones control (DMSO), mucho más rápida (**Figura 27A**). De este resultado se deduce claramente que el Fr2^{QQQ} es un sustrato del proteasoma.

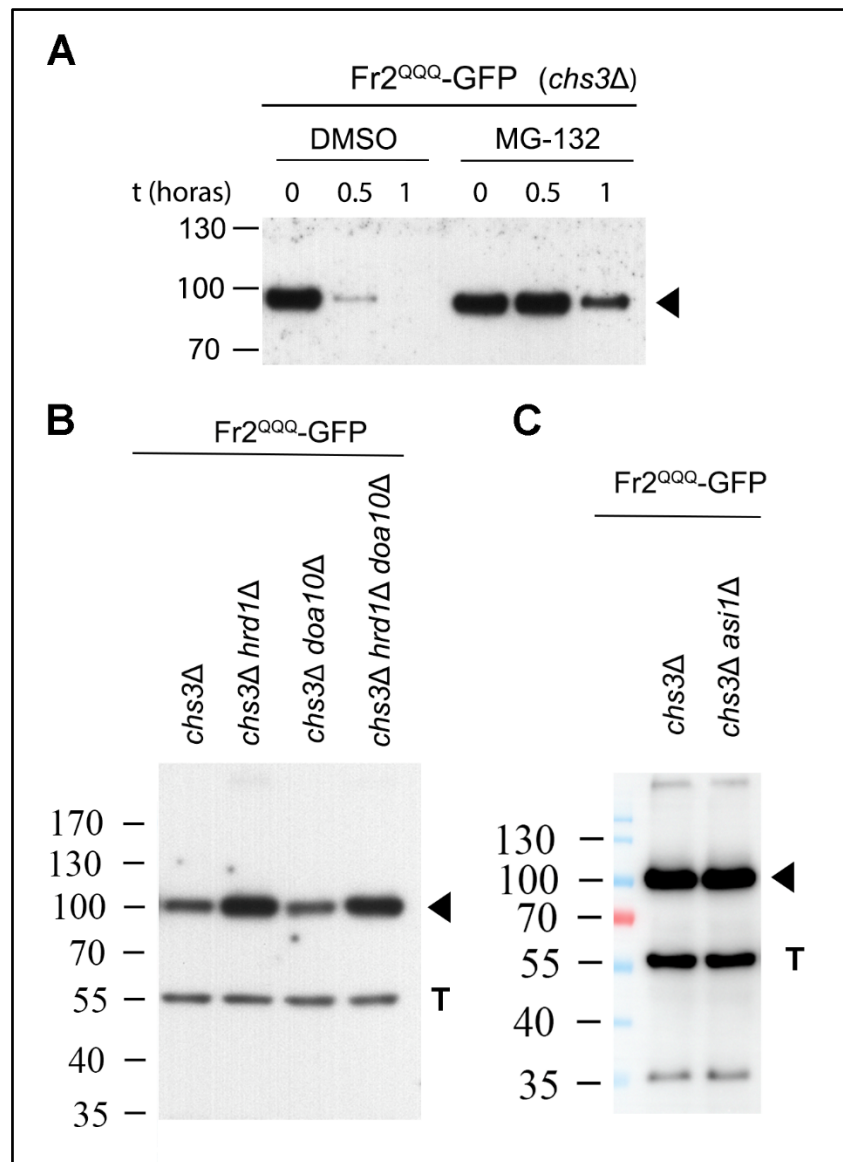


Figura 27. A) Cinética del Fr2^{QQQ}-GFP en una cepa *chs3Δ* en presencia de DMSO (control) y el inhibidor del proteasoma MG-132. B) Nivel de proteína del Fr2^{QQQ}-GFP en *chs3Δ* y los mutantes de ERAD. C) Nivel de proteína del Fr2^{QQQ}-GFP en *chs3Δ* y el mutante de INMAD *asi1Δ* (*chs3Δ*).

Una vez visto el papel del proteasoma en la degradación del Fr2^{QQQ}-GFP, nos propusimos determinar cuál era el complejo E3 implicado en su reconocimiento y degradación analizando para ello los niveles de la proteína en los mutantes de las E3s canónicas de ERAD (Hrd1 y Doa10) y del complejo Asi de INMAD. En estos experimentos observamos como únicamente el complejo Hrd1 parecía estar implicado en la degradación de la quimera mutante de N-glicosilación al presentar el mutante *chs3Δ hrd1Δ* un considerable aumento en la cantidad de esta proteína con respecto a la presente en la cepa control *chs3Δ* (**Figura 27B**), cantidad de proteína que se mantenía en los mutantes *doa10Δ* (**Figura 27B**) y *asi1Δ* (**Figura 27C**). La implicación de Hrd1 en su degradación, así como la localización de los sitios mutados de N-glicosilación en el dominio luminal de la proteína, sugerían que el Fr2^{QQQ} se comportaba como un sustrato típico de ERAD-L.

Como conclusión, y comparando los resultados presentados aquí para el Fr2^{QQQ} con los obtenidos previamente para su versión glicosilada, podemos decir que mientras que el Fr2 glicosilado es sustrato del complejo Asi con una cinética de degradación muy lenta, el mutante de N-glicosilación es reconocido más eficientemente por el complejo Hrd1 y, por lo tanto, degradado en mayor medida por el proteasoma. La mayor eficiencia en la degradación del Fr2^{QQQ} por el complejo Hrd1 con respecto a la de su versión glicosilada por el complejo Asi podía deberse a que éste presentase un degrón más potente, a que al encontrarse Hrd1 en la membrana del RE el acceso a este complejo fuese mucho más rápido, o bien a una combinación de ambas cosas.

3.3.2. Chs3 mutado en los sitios de N-glicosilación es también sustrato del proteasoma.

El trabajo previo en el laboratorio con los mutantes de N-glicosilación no había mostrado grandes diferencias ni en la localización ni en la función de estos con respecto a la proteína silvestre ya que se localizaban mayoritariamente en el cuello (**Figura 28C**) y eran funcionales al restaurar la sensibilidad a CW (**Figura 28A**) y la síntesis de quitina (**Figura 28B**) de un mutante *chs3Δ*. Sin embargo, el triple mutante de N-glicosilación (*Chs3^{N303/332/371Q}* al que denominamos *Chs3^{QQQ}*) presentaba una ligera resistencia a CW, de acuerdo con los ensayos de gota, que no se había llegado a explicar (**Figura 28A**, Sacristan et al., 2013).

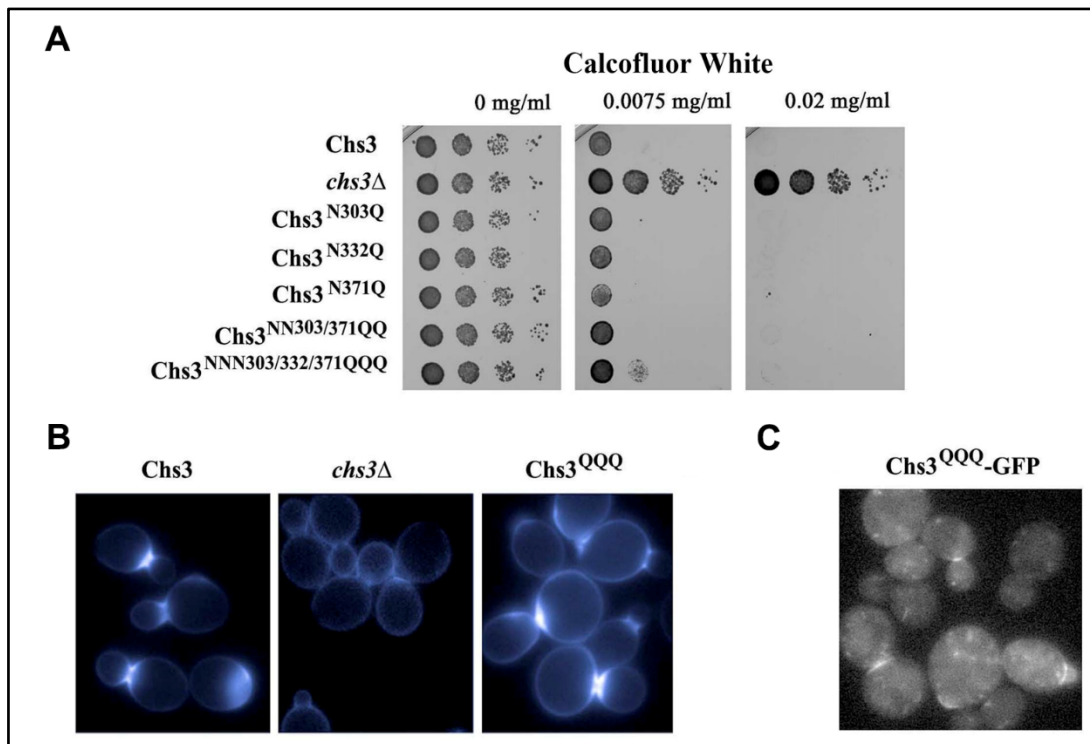


Figura 28. A) Ensayo de gota para comparar la sensibilidad a CW entre Chs3 (WT), el mutante *chs3Δ* y distintos mutantes de N-glicosilación de Chs3. B) Tinción con CW de Chs3 (WT), el mutante *chs3Δ* y Chs3^{QQQ}. C) Microscopía de fluorescencia de Chs3^{QQQ}-GFP en un mutante *chs3Δ*. Datos de C.Sacristán.

Considerando esto y los resultados previos obtenidos con el Fr2^{QQQ}, nos preguntábamos si esta ligera resistencia al CW de la proteína Chs3^{QQQ} se debía a que una parte de la proteína era reconocida por ERAD/INMAD y dirigida a la degradación proteasomal, alcanzando así la MP en menor medida y traduciéndose esto, por lo tanto, en una menor cantidad de quitina en la pared. Esta hipótesis era en principio consecuente con la mayor estabilidad de la proteína Chs3-GFP frente a Chs3^{QQQ}-GFP, que se deducía de los niveles considerablemente mayores de proteína observados para la primera en los experimentos de Western Blot, así como de la mayor intensidad de la banda de degradación proteasomal de la segunda (**Figura 29B**).

Para confirmar dicha hipótesis lo primero que hicimos fue hacer experimentos de inhibición del proteasoma en una cepa *chs3Δ* conteniendo una u otra versión de la proteína, con el objetivo de comparar la posible estabilización de cada una por el inhibidor del proteasoma MG-132. En estos experimentos observamos como la proteína silvestre Chs3 es relativamente estable y su tasa de degradación no se ve afectada por el MG-132, lo que sugiere que Chs3 no es un sustrato del proteasoma en estas condiciones (**Figura 29A**, panel izquierdo). Este resultado concuerda con lo obtenido en la búsqueda masiva para Chs3. Por el contrario, en la **Figura 29A**, panel derecho, se puede ver como la proteína Chs3^{QQQ}-GFP se degrada rápidamente tras inhibir su síntesis con cicloheximida y como esta degradación es inhibida casi completamente por el inhibidor MG-132, lo que identifica claramente a esta proteína como un sustrato del proteasoma.

En su conjunto estos resultados sugieren que mientras que Chs3 no es sustrato del proteasoma en condiciones normales, su versión no glicosilada Chs3^{QQQ} sí que lo es, constituyendo además un sustrato típico de ERAD-L reconocido por Hrd1 debido a la localización luminal de este defecto en la N-glicosilación de la proteína.

3.3.3. Efecto de la agregación y de la retención en el RE sobre la degradación de Chs3/Chs3^{QQQ}.

Todas las evidencias anteriores están obtenidas en una cepa WT en la que la proteína se pliega correctamente y es exportada eficientemente del RE, independientemente de su glicosilación (**Figura 28** y Sacristan et al., 2013). Teniendo en cuenta que la chaperona Chs7 es necesaria para el plegamiento y salida del RE de Chs3 y que en su ausencia la proteína se agrega (Kota & Ljungdahl, 2005; Lam et al., 2006) y es incapaz de salir de este compartimento (Trilla et al., 1999), decidimos utilizar un mutante *chs7Δ* para explorar el posible papel de estos dos fenómenos, agregación y retención en el RE, en el acceso a los sistemas de ERAD/INMAD tanto de Chs3 como de Chs3^{QQQ}. Este estudio podía ser interesante puesto que en la bibliografía se ha descrito que para ciertos cargos hay una competición entre los mecanismos de salida del RE y los de retención pudiendo afectar dicha competición a la mayor o menor degradación de la proteína por los sistemas de eliminación del RE (Kincaid & Cooper, 2007). Igualmente, el estudio del posible efecto de la agregación de Chs3/ Chs3^{QQQ} en ausencia de Chs7 sobre su degradación por ERAD/INMAD podía ser también relevante para el campo si consideramos la implicación de la formación de agregados tóxicos en el desarrollo de numerosas enfermedades.

Para estudiar esto llevamos a cabo experimentos de microscopía y cinéticas con cicloheximida con el objetivo de analizar el comportamiento de las proteínas Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en presencia/ausencia de la chaperona Chs7. En los experimentos de microscopía incluimos también al mutante de COPII *sec31-1*, mutante en el que la salida del RE de Chs3 debía de verse bloqueada, pero en el cual no debería producirse la agregación causada en el mutante *chs7Δ* al ser Chs7 la chaperona específica de Chs3.

En los mutantes *chs7Δ* y *sec31-1* (temperatura restrictiva) observábamos como la proteína Chs3^{QQQ}-GFP presentaba un claro incremento en la señal citosólica (**Figura 30A**, fila inferior), indicativo de su degradación proteasomal. Por el contrario, Chs3-GFP quedaba retenida en el RE sin aparente señal citosólica, aunque en el mutante *sec31-1* se observaban también una serie de puntos discretos que recordaban a los ERES (**Figura 30A**, fila superior). Del conjunto de estos resultados se deduce que Chs3 es relativamente refractaria a la degradación proteasomal independientemente de su retención en el RE; por el contrario, la proteína sin glicosilar Chs3^{QQQ} es susceptible a la degradación proteasomal, siendo mucho más sensible a dicha degradación al quedar retenida en el RE, independientemente de la causa de su retención.

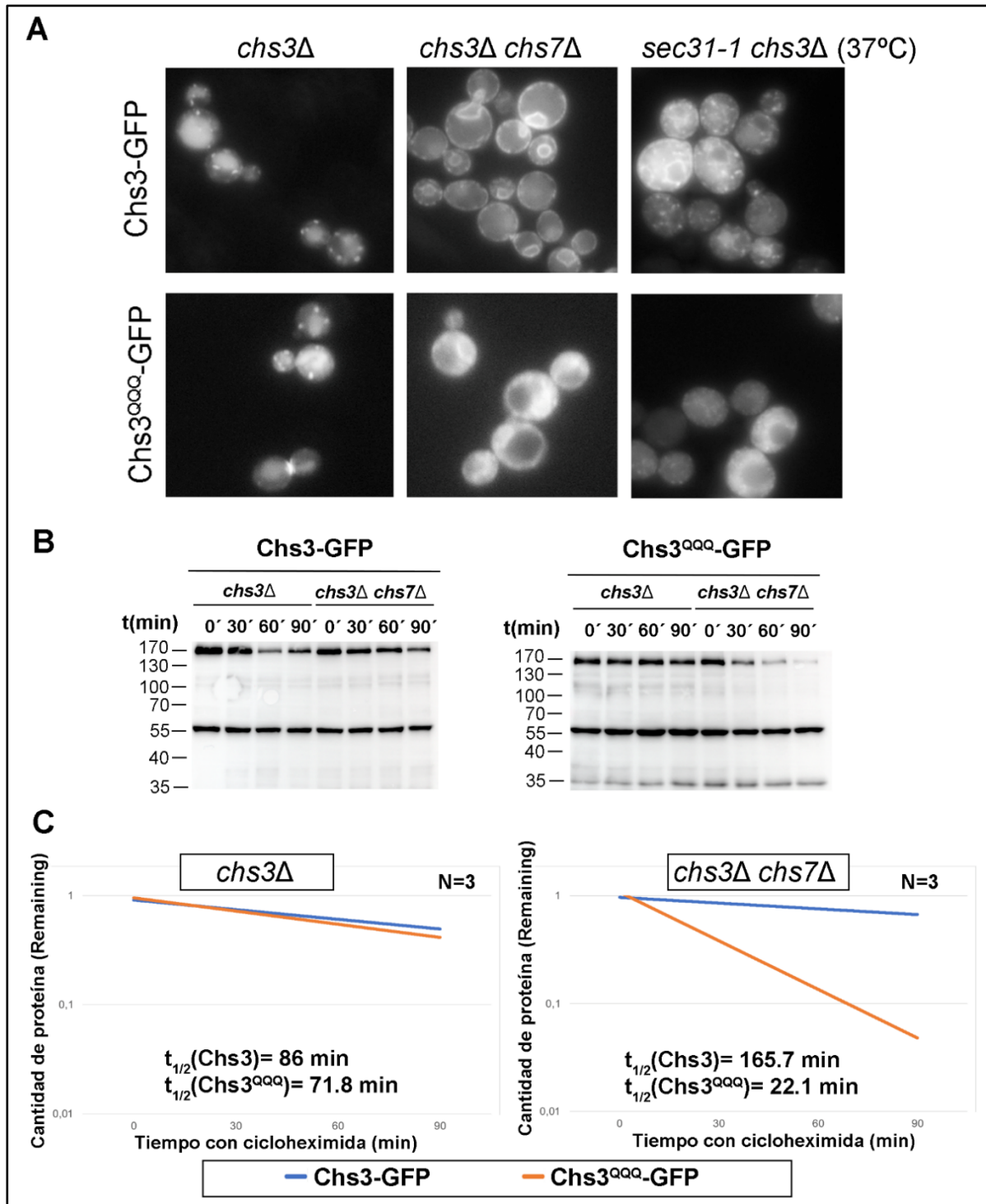


Figura 30. A) Localización de Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en cepas *CHS7/chs7Δ* y en el mutante *sec31-1* a la temperatura restrictiva. B) Cinéticas de degradación con cicloheximida de Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en cepas *CHS7/chs7Δ*. C) Representación de líneas de tendencia (ajuste exponencial) para los datos de las cinéticas (N=3). El eje Y se encuentra en escala logarítmica y se señala la vida media ($t_{1/2}$) en cada caso, calculada a partir de la ecuación correspondiente al ajuste.

Para confirmar estas observaciones microscópicas decidimos estudiar también las cinéticas de degradación de las proteínas Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP inhibiendo la síntesis *de novo* de las mismas con cicloheximida (**Figura 30B**). Estos experimentos se llevaron a cabo solo en el mutante *chs7Δ* ya que este nos permitía trabajar más fácilmente sin necesidad de cambiar la temperatura, asegurando además la retención total de nuestras proteínas. En la **Figura 30C** puede observarse la degradación marginal de las proteínas Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en la cepa *CHS7*. Sin embargo, en el mutante *chs7Δ* la proteína silvestre Chs3-GFP permanece estable, mientras que la proteína Chs3^{QQQ}-GFP es fuertemente degradada, resultados muy similares a los observados para el Fr2 en comparación al Fr2^{QQQ} en *chs3Δ* (**Figura 26C**). Al examinar estadísticamente los datos de las cinéticas en 3 experimentos diferentes (**Figura 30C**) observamos como las pendientes de degradación de Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP eran similares en la estirpe silvestre (*CHS7*), pero muy distintas en el mutante *chs7Δ*. En este último mutante la vida media ($t_{1/2}$) de la proteína Chs3 (165.7 minutos) era incluso superior a la observada en la cepa silvestre (86 minutos) probablemente debido al bloqueo de la vía endocítica a la vacuola, consecuencia de su retención en el RE en *chs7Δ*. Por el contrario, la vida media de Chs3^{QQQ}-GFP en el mutante *chs7Δ* era considerablemente inferior (22.1 min) a la presente en la estirpe silvestre (71.8 minutos) a pesar del bloqueo de la citada vía.

Aunque la proteína silvestre parecía retenerse en el RE sin aparente degradación proteasomal en el mutante *chs7Δ*, en los Western Blots solíamos ver una menor cantidad de proteína total e intuir la banda típica de degradación proteasomal (**Figura 31A**; P), lo que sugería que en estas condiciones incluso la proteína silvestre pudiera ser un sustrato poco eficiente de ERAD/INMAD. Para comprobar este punto evaluamos la degradación de Chs3-GFP en mutantes de las E3s ubiquitina ligasas canónicas de ERAD (Hrd1 y Doa10) en ausencia de Chs7; sin embargo, la ausencia de ninguna de estas parecía tener papel alguno en la degradación de la proteína (no mostrado). Recientemente se había descrito que Chs3 forma un complejo con Chs7 (Dharwada et al., 2018) y que el complejo Asi de la MNI puede reconocer subunidades desensambladas de complejos proteicos (Natarajan et al., 2020), por lo que decidimos analizar si había un papel de este complejo E3 en la degradación de Chs3 en ausencia de su chaperona. Aunque no hemos sido capaces de detectar una disminución significativa de la degradación de Chs3-GFP, la desaparición de la banda de procesamiento proteasomal en el mutante *asi1Δ* (**Figura 31A**, P) sugería que Chs3 era un sustrato del complejo Asi en ausencia de su chaperona. Este complejo E3 también parecía tener un papel en la degradación del mutante de N-glicosilación de acuerdo con el aumento en el nivel de proteína observado (**Figura 31B**), si bien en este caso no veíamos una atenuación en la intensidad de la banda de procesamiento proteasomal, lo que podía explicarse por el papel adicional en la degradación de Hrd1 sobre este mutante, ya demostrado en el apartado anterior. Este papel del complejo Asi, a mayores del de Hrd1, sobre la proteína Chs3^{QQQ} contrastaba con lo observado para el Fr2^{QQQ} que únicamente era sustrato de Hrd1 (**Figura 27B y C**).

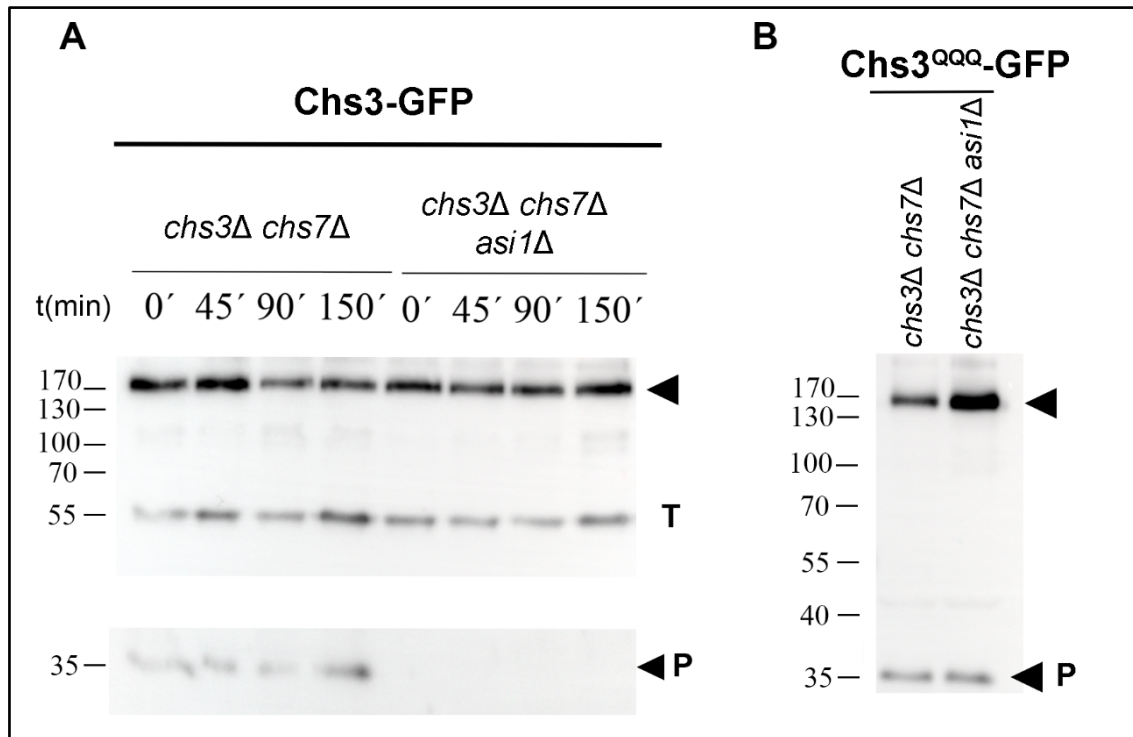


Figura 31. A) Cinética con cicloheximida de Chs3-GFP en *chs3Δ chs7Δ* y *chs3Δ chs7Δ asi1Δ*. B) Western Blot de Chs3^{QQQ}-GFP en *chs3Δ chs7Δ* y *chs3Δ chs7Δ asi1Δ*. T= Tubulina.

Todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de la N-glicosilación para prevenir la degradación proteasomal de Chs3 en ausencia de su chaperona Chs7, lo que indicaría que de alguna manera esta modificación postraduccional estaría evitando el acceso a los sistemas de ERAD/INMAD de la proteína.

Podríamos pensar que la posible agregación de nuestras proteínas en el mutante *chs7Δ* era la que facilitaba el reconocimiento de estas por los sistemas de ERAD/INMAD; sin embargo, la evidencia microscópica indicaba que esta degradación se producía también notablemente en el mutante de COPII *sec31-1* (37°C), lo que sugería que era principalmente la retención en el RE la responsable de dicha degradación (**Figura 30A**). Aun así, no podemos descartar el papel de Chs7 como chaperona por lo que nuestra hipótesis es que en su ausencia lo que se produce es un efecto combinado de la agregación de Chs3/Chs3^{QQQ} que se sumaría a la retención de estas proteínas en el mutante *chs7Δ*, conduciendo esto a un mayor acceso de los complejos E3 de ERAD/INMAD a estas proteínas que favorecería su degradación proteasomal. A mayores, y como se analizará en el siguiente capítulo de resultados, la falta de Chs7 provoca que no se forme el complejo Chs3-Chs7 y ese defecto en el ensamblaje de las subunidades parece ser también una de las claves para el acceso a ERAD/INMAD.

3.3.4. La posición y el número de sitios N-glicosilados en Chs3 condiciona su acceso a ERAD/INMAD.

Para ampliar el estudio nos propusimos analizar cómo afectaba la variación en la posición y el número de sitios N-glicosilados en el acceso a los sistemas de degradación de la proteína. Para ello partimos de los mutantes simples ($\text{Chs3}^{\text{N303Q}}$, $\text{Chs3}^{\text{N332Q}}$ y $\text{Chs3}^{\text{N371Q}}$), de un mutante doble ($\text{Chs3}^{\text{N303/371Q}}$) y del mutante triple de N-glicosilación ($\text{Chs3}^{\text{N303/332/371Q}}$ o Chs3^{QQQ}) de Chs3, los cuales habían sido construidos previamente en el laboratorio (Sacristan et al., 2013) demostrándose que todos ellos eran funcionales. Teniendo en cuenta que en ausencia de la chaperona Chs7 se veía mucho mejor el efecto de ERAD/INMAD, decidimos utilizar al doble mutante $\text{chs3}\Delta \text{chs7}\Delta$ para llevar a cabo cinéticas de degradación en presencia de cicloheximida de los distintos mutantes de N-glicosilación y de la proteína silvestre. En esta cepa todas estas proteínas mutantes de N-glicosilación quedaban retenidas en el RE (no mostrado).

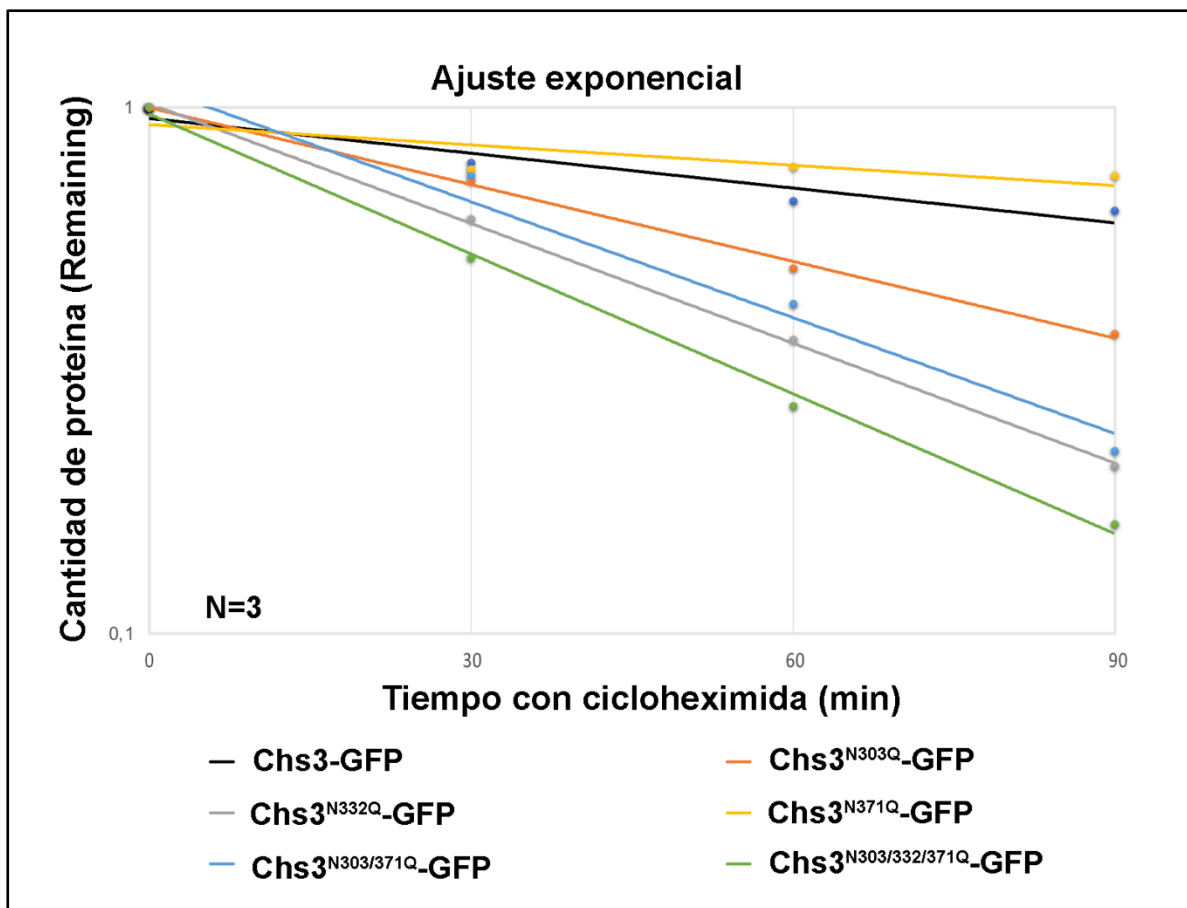


Figura 32. Ajuste exponencial de los datos de cinéticas de degradación para Chs3-GFP y los mutantes de N-glicosilación indicados en el mutante $\text{chs3}\Delta \text{chs7}\Delta$.

En la **Figura 32** se muestran las diferentes cinéticas de degradación de estas proteínas. Los resultados que se desprenden de estos datos son complejos de interpretar debido a los diferentes parámetros estructurales que habría que tener en cuenta, pero a partir de ellos se puede deducir:

1. Los sitios de N-glicosilación más importantes para prevenir la degradación de la proteína son, por orden de importancia, el sitio N332 y después el N303. La eliminación del sitio N371 no parece provocar ningún efecto, lo que concuerda con el hecho de que hasta el momento solo se haya demostrado experimentalmente la N-glicosilación de los sitios N303 y N332 (Zielinska et al., 2012).
2. Se tiene que producir al menos la N-glicosilación de 2 sitios para prevenir la degradación masiva de la proteína siendo además uno de esos sitios la asparagina N332. Esto se deduce de la observación de que la proteína $\text{Chs3}^{\text{N303/371Q}}$, que mantendría el sitio N332 N-glicosilado, presente una cinética de degradación similar a la de la proteína $\text{Chs3}^{\text{N332Q}}$, lo que indica que no basta con mantener glicosilada únicamente a la proteína en el sitio N332 para prevenir su degradación. De la misma manera, la glicosilación conjunta de los sitios N303 y N371 no previene significativamente de la degradación. Adicionalmente, de la comparación de las cinéticas de los mutantes simples de N-glicosilación se infiere que mantener glicosiladas las asparaginas N332 y N303 (equivalente a $\text{Chs3}^{\text{N371Q}}$) es más efectivo para evitar la degradación que mantener glicosiladas a N332 y N371 (equivalente a $\text{Chs3}^{\text{N303Q}}$). Esto concuerda con la conclusión 1 y sugiere que en condiciones WT son los sitios N332 y N303 los que se encuentran normalmente N-glicosilados.
3. Los resultados sugieren que es probable que en condiciones normales el residuo N371 no esté glicosilado, lo que explicaría la ausencia de efecto de su mutación individual. Sin embargo, su efecto aditivo sobre las otras mutaciones sugiere que este residuo es N-glicosilable, por lo que podría estar glicosilándose en determinadas situaciones y contribuyendo así globalmente a prevenir la degradación de la proteína.

Como conclusión a estos experimentos podemos decir que tanto el número de sitios N-glicosilados como su posición en Chs3 influyen en el adecuado plegamiento de la proteína y, por lo tanto, en la regulación de su acceso a los sistemas de ERAD/INMAD.

3.3.5. La falta de N-glicosilación conduce a un estado superior de agregación.

Considerando los resultados previos, decidimos estudiar el posible efecto de la falta de N-glicosilación en la conformación de la proteína con el objetivo de encontrar una posible explicación al reconocimiento por ERAD/INMAD de los mutantes de N-glicosilación. Puesto que ERAD/INMAD reconoce fundamentalmente proteínas desplegadas, decidimos analizar si la carencia de N-glicosilación conducía a un estado de desplegamiento y/o agregación que favoreciese el reconocimiento de la proteína por la maquinaria de degradación. Para abordar este punto realizamos experimentos de agregación usando el cross-linker DSP (Ver Materiales y Métodos) con el objetivo de comparar la agregación entre las versiones glicosiladas y no glicosiladas de Chs3 y del Fr2. En el caso del Fr2 los experimentos se realizaron directamente en un mutante *chs3Δ*, mientras que para Chs3 usamos el mutante *chs3Δ chs7Δ* para garantizar la retención de la proteína y facilitar su posible agregación.

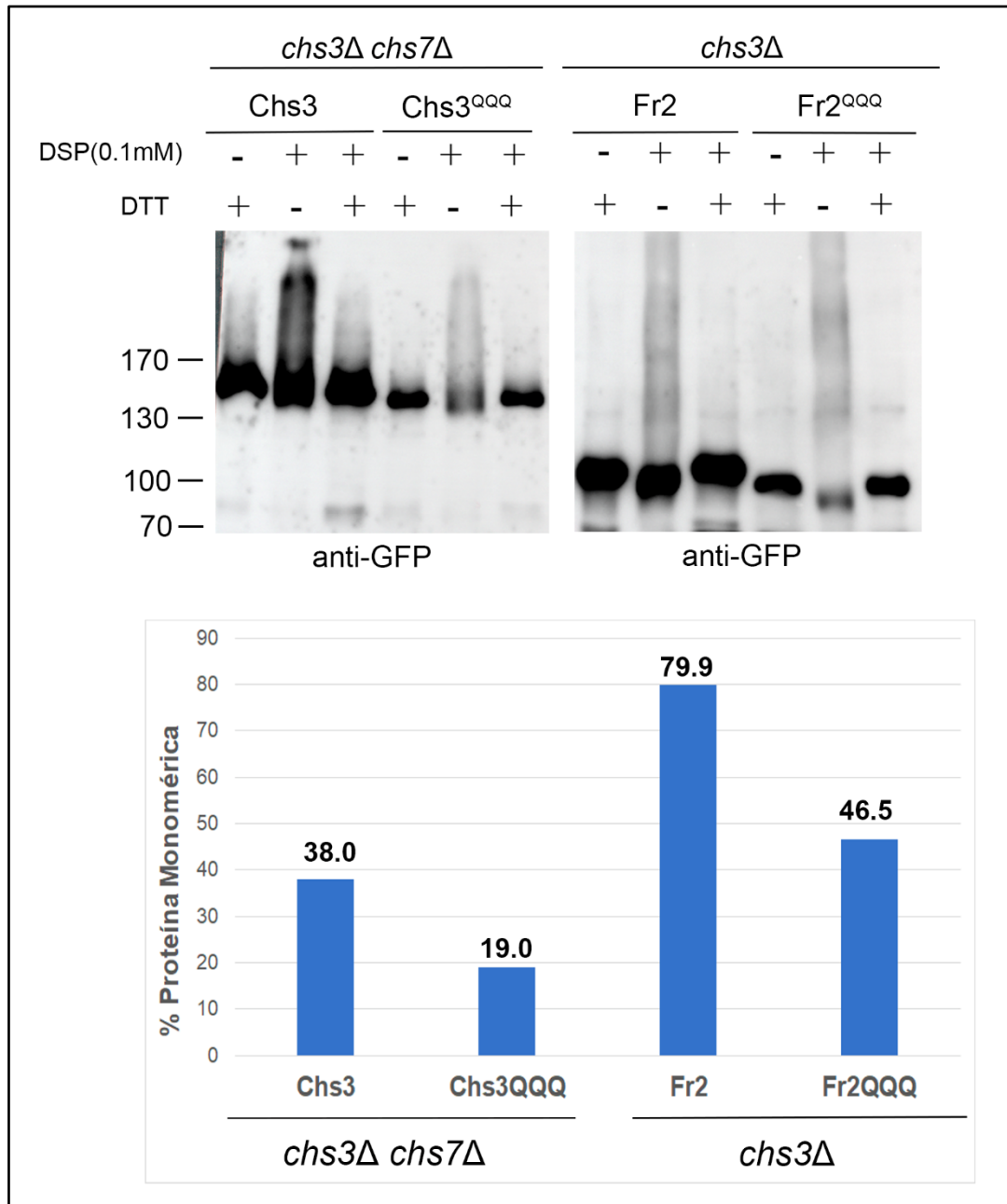


Figura 33. Estudio comparativo de la agregación de versiones glicosiladas y no glicosiladas de Chs3 y el Fr2, marcadas con GFP en las cepas indicadas.

En estos experimentos determinamos el porcentaje de banda monomérica para cada proteína en cada cepa asumiendo que el 100% de intensidad de esa banda se correspondía con la de los carriles en los que neutralizábamos el efecto del DSP tratando nuestras muestras con DTT. En la **Figura 33** podemos observar como el DSP induce la agregación parcial de la proteína silvestre Chs3-GFP, agregación que es mucho mayor para la proteína Chs3^{QQQ}-GFP, al encontrarse solo el 19% de la misma en estado monomérico. Resultados similares se obtuvieron para la proteína Fr2^{QQQ}-GFP, disminuyendo casi a la mitad su porcentaje de proteína monomérica con respecto al de su versión glicosilada Fr2-GFP.

Se puede por lo tanto concluir que la ausencia de N-glicosilación favorece la agregación de estas proteínas, lo que podría provocar un reconocimiento más eficiente de estas por los sistemas de ERAD/INMAD actuando dicha agregación como una señal de desplegamiento o degrón adicional.

3.3.6. Distintas chaperonas participan en el reconocimiento de Chs3^{QQQ} y el Fr2^{QQQ}.

En vista de que tanto la proteína Chs3^{QQQ} como el Fr2^{QQQ} eran sustratos de ERAD/INMAD, estas debían estar siendo reconocidas por distintos factores que facilitasen su acceso a los complejos E3s implicados en su degradación. Teniendo en cuenta esto quisimos analizar cuáles eran las chaperonas y/o factores proteicos implicados en el reconocimiento de nuestras proteínas no glicosiladas. Hay muy poca información en la bibliografía acerca del reconocimiento de sustratos no glicosilados por ERAD-L, aunque parece clara la implicación de Kar2 y sus cochaperonas Hsp40 (Scj1, Jem1) (Ninagawa et al., 2021). Para algunos sustratos de ERAD-L no glicosilados se ha descrito un papel de la lectina Yos9 (Jaenicke et al., 2011), principal factor de reconocimiento de sustratos de ERAD-L glicosilados. De entre todos estos analizamos en un primer momento el papel de la proteína Yos9, pero la degradación de nuestras proteínas no glicosiladas no se veía alterada en el mutante *yos9Δ* (no mostrado). Al examinar qué ocurría en el mutante *chs3Δ scj1Δ jem1Δ* detectamos que este presentaba una mayor cantidad de proteína del Fr2^{QQQ}-GFP en comparación a la cepa control *chs3Δ*, superior incluso a la presente en el mutante del complejo Hrd1 que como hemos visto era el implicado en su degradación (**Figura 34A**). En estos mutantes se detectó además una banda superior, relativamente abundante, que sugería la agregación de esta proteína (**Figura 34A**, Ag). Los resultados para la proteína Chs3^{QQQ}-GFP no fueron tan claros, aunque la ausencia de las chaperonas Scj1 y Jem1 parecía también favorecer la aparición de una banda de gran tamaño que podía estar sugiriendo la agregación de la proteína. Es muy posible que en este último caso el gran tamaño de esta dificulte su visualización.

Al analizar el papel de la chaperona Cne1 (homólogo a CNX y CRT de mamíferos) en el procesamiento de Chs3^{QQQ}-GFP observamos un incremento en la intensidad de la banda de procesamiento proteasomal en el mutante *cne1Δ* (**Figura 34B**, P). El papel de Cne1 en *S.cerevisiae* no está muy bien definido al no existir ciclo CNX/CRT en dicho organismo. En el caso de Chs3^{QQQ}, el papel de Cne1 parecía ser el de retener a la proteína en el RE seguramente para mediar su replegamiento previniendo así un acceso prematuro de esta a ERAD/INMAD. Nuestros resultados indicarían asimismo que la ausencia de Cne1 facilita también el transporte anterógrado de Chs3 y su chaperona Chs7 (**Figura A2**, Anexo), lo que sugiere un papel más general de esta chaperona en el tráfico de proteínas y, en concreto, de Chs3. No vimos efecto alguno de Cne1 en el caso del Fr2^{QQQ}-GFP (resultados no mostrados).

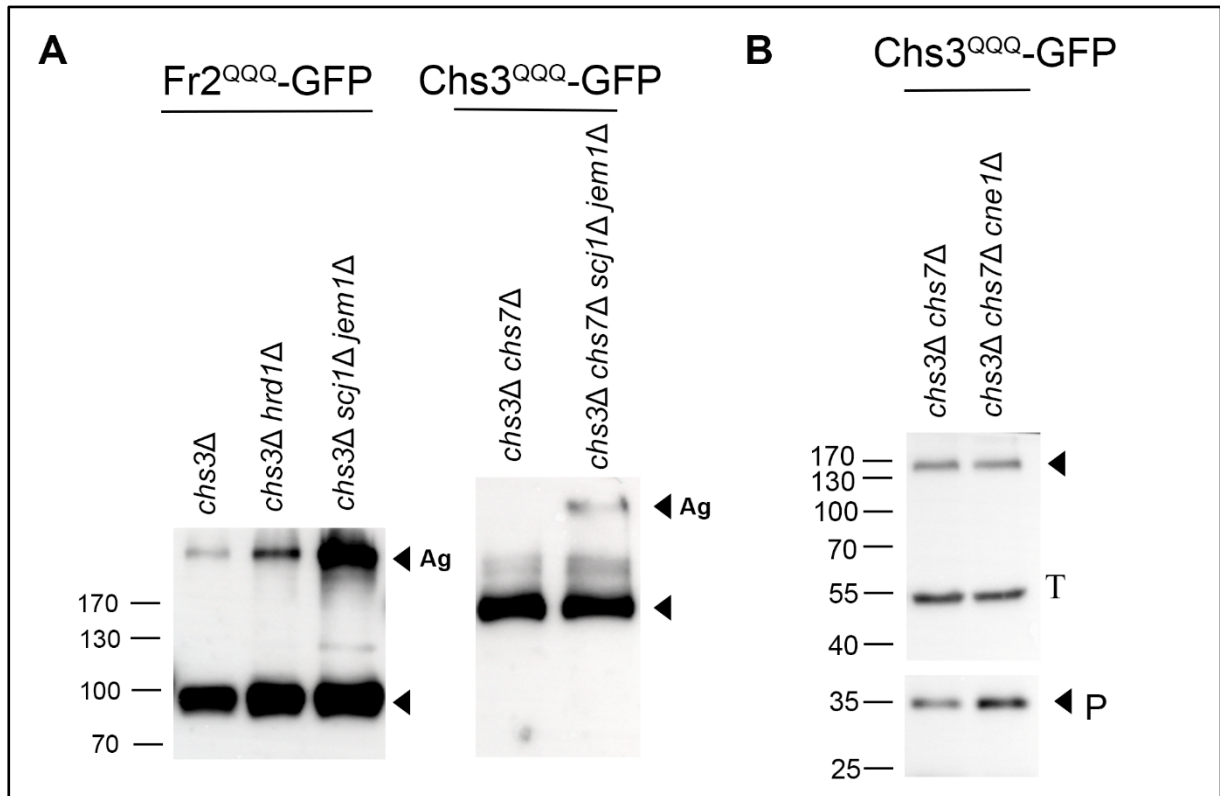


Figura 34. A) Western Blots de Fr2^{QQQ}-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en las cepas indicadas. B) Procesamiento de Chs3^{QQQ}-GFP en función de la presencia de Cne1 en un mutante *chs3Δ chs7Δ*. Ag= Agregado. T=Tubulina.

En resumen, nuestros resultados indicarían que las proteínas Chs3^{QQQ} y Fr2^{QQQ} serían reconocidas por múltiples chaperonas del RE. Estas chaperonas en el caso de Scj1 y Jem1 parecían estar contribuyendo a mantener la solubilidad en el RE de sus sustratos desplegados (Fr2^{QQQ}, y Chs3^{QQQ} en menor medida) facilitando así su acceso a la maquinaria de degradación cuando se encontraban terminalmente desplegados y evitando su agregación masiva en este compartimento. En el caso de Cne1, su papel sobre Chs3^{QQQ} parecía estar asociado con el replegamiento de la proteína para prevenir o retrasar su acceso a ERAD/INMAD.

3.4. EL PAPEL DEL DOMINIO LUMINAL DE Chs3 EN EL CONTROL DEL PLEGAMIENTO DE LA PROTEÍNA Y SU SALIDA DEL RE.

Tomando en consideración el importante papel que parece estar jugando la N-glicosilación en el QC de Chs3, nos planteamos ver qué pasaba si en lugar de mutar los sitios de N-glicosilación eliminábamos total o parcialmente el dominio luminal de la proteína. Construimos para ello nuevas quimeras que contenían deleciones en este dominio (Ver Materiales y Métodos). Para hacer la visualización e interpretación de resultados más sencilla recogemos aquí solo los resultados obtenidos con las quimeras Chs3^{Δ238-441}, Chs3^{Δ260-390} y Chs3^{Δ310-441}, aunque las conclusiones que se deducen aquí se desprenden del conjunto de resultados obtenidos a partir del trabajo con todas ellas.

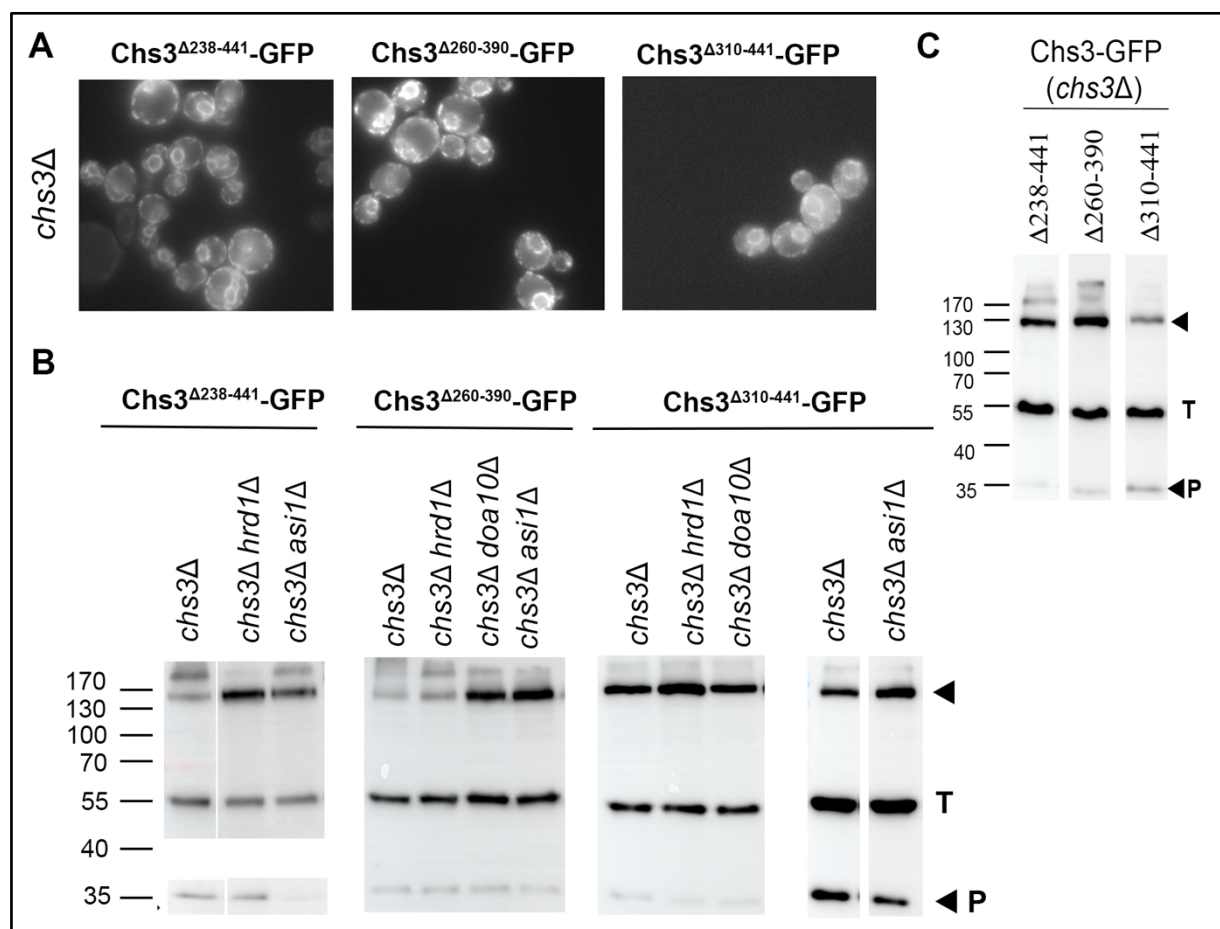


Figura 35. A) Localización de quimeras del dominio luminal de Chs3 indicadas en el mutante *chs3Δ*. B) Western Blots de las quimeras del dominio luminal en la cepa *chs3Δ* y distintos mutantes de ERAD/INMAD. C) Western Blot de quimeras del dominio luminal de Chs3 en una cepa *chs3Δ*. T=Tubulina.

Del análisis de la localización de estas quimeras se deduce que el mantenimiento de este dominio es esencial para la salida del RE de Chs3 al quedar todas estas quimeras retenidas en el RE, con cierta señal citoplásmica (**Figura 35A**). El análisis de su procesamiento en los distintos mutantes de ERAD/INMAD indicó que las quimeras Chs3^{Δ238-}

⁴⁴¹-GFP y Chs3^{Δ310-441}-GFP veían aumentados sus niveles en los mutantes de Hrd1 y Asi, mientras que los niveles de la quimera Chs3^{Δ260-390}-GFP se incrementaban fundamentalmente en ausencia de Asi y Doa10 (**Figura 35B**).

Las conclusiones que se desprenden del conjunto de los resultados obtenidos son:

1. Cualquier delección en la región luminal conduce a una retención en el RE y a un reconocimiento por el complejo Asi. Esto sugiere que mantener la longitud de este dominio es esencial para el plegamiento y/o colocación en la membrana de los dominios TM que delimitan dicha región puesto que este complejo E3 reconoce degrones en dominios TM. El defecto generado en el plegamiento de estos dominios TM al eliminar parte de la región luminal parece asimismo mucho más importante que el del Fr2 (**Figura 21**) ya que el reconocimiento por Asi de estos dominios es mucho más eficiente en este caso.
2. Ante una delección grande en el dominio luminal de Chs3 ($\Delta 238-441$) prevalece el papel de Hrd1, probablemente ligado a la falta de casi toda la región luminal de Chs3 (ERAD-L). Si bien tampoco se puede descartar que Hrd1 pueda estar participando de forma conjunta con Asi en ERAD-M.
3. Si la delección es más pequeña y no hay ningún sitio de N-glicosilación libre ($\Delta 260-390$) entonces se pierde considerablemente el efecto de Hrd1 en favor de Doa10, seguramente porque el degrón luminal no es tan potente al no perderse gran parte del dominio como sí que ocurría en el caso de la quimera Chs3^{Δ238-441}.
4. Si la delección es más pequeña, pero queda al menos un sitio libre de N-glicosilación ($\Delta 310-441$), esa hipoglicosilación parecía ser suficiente para redirigir la degradación a ERAD-L de glicoproteínas (Hrd1), la cual además resultaba más efectiva en la degradación (**Figura 35C**).

4. FRAGMENTO 1. LA AGREGACIÓN COMO UN MECANISMO DE QC BENEFICIOSO PARA LA CÉLULA.

Como hemos comentado al inicio del análisis con todos los fragmentos, el Fragmento 1 (Fr1) presentaba unas características diferentes al resto de fragmentos localizándose no solo en el RE, sino también en forma de puntos discretos, sin ser degradado de acuerdo con nuestros experimentos de Western Blot. Esta localización sugería una posible retención post-Golgi que podía ser muy interesante para nuestro objetivo de partida. Para estudiar qué estaba pasando con este fragmento nos propusimos determinar primero en qué compartimento celular se localizaban los puntos de esta quimera. Se realizaron así experimentos de colocalización con marcadores de distintos compartimentos de la ruta secretora: Sec13 (ERES/COPII), Sed5 (cis-Golgi), Sec7 (TGN) y Atg8 (PAS="Pre-autophagosomal structure"). No fuimos capaces de detectar una colocalización significativa del Fr1 con ninguno de estos marcadores (no mostrado). Para refinar este estudio se llevó a cabo posteriormente un estudio de la dinámica de los puntos asociados a este fragmento mediante experimentos de time-lapse en el microscopio comparando esta dinámica con la de los puntos asociados a los marcadores de ERES/COPII (Sec13), Golgi tardío (Chs5 y Sec7) y cis-Golgi (Sed5) en una

cepa WT. De nuevo, la dinámica celular de estos puntos era significativamente diferente a la de todos los marcadores utilizados (no mostrado). Estos resultados apuntaban a una localización diferente a la esperada.

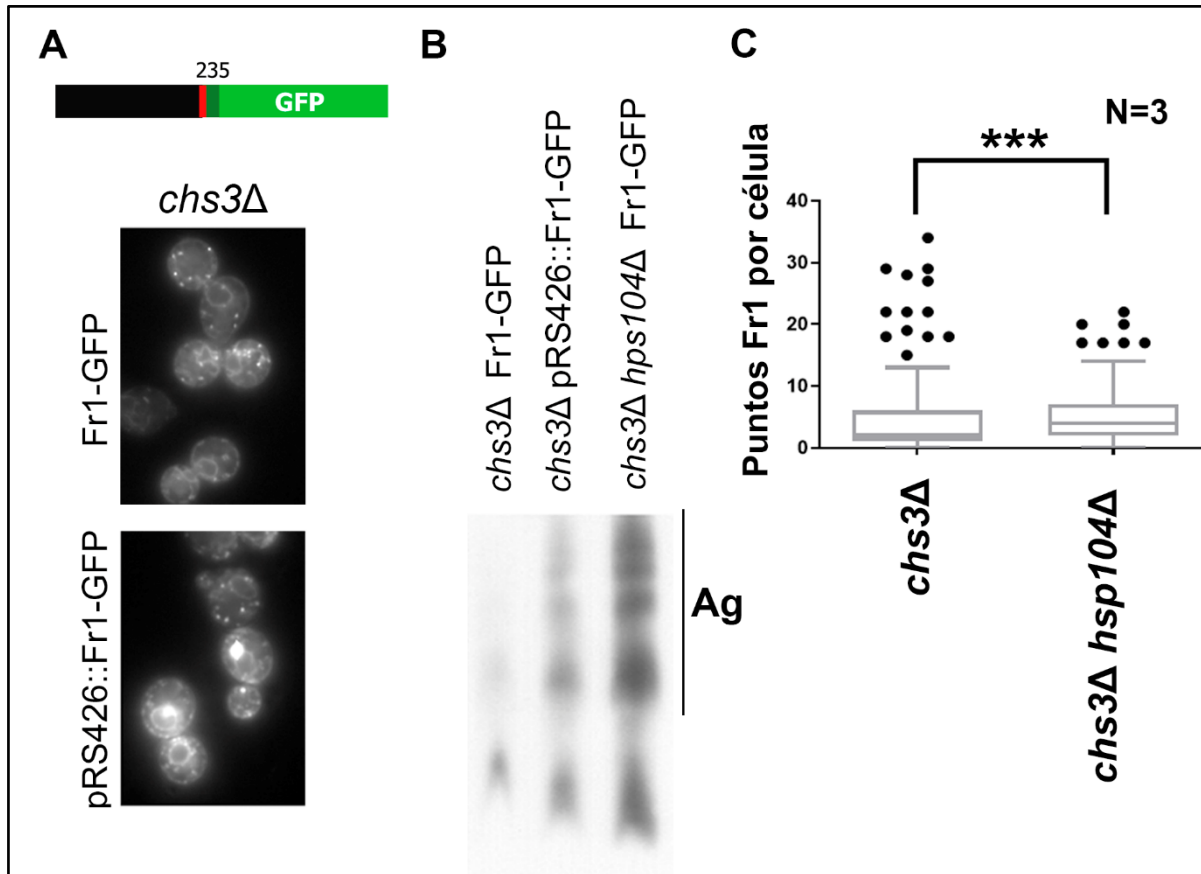


Figura 36. A) Topología y localización del Fr1-GFP a niveles normales (pRS315) y sobreexpresado (pRS426) en una cepa *chs3Δ*. B) BN-Page para el Fr1-GFP sobreexpresado y sin sobreexpresar en *chs3Δ* y el mutante *chs3Δ hsp104Δ*. Observar el *smear* superior de agregación (Ag). C) Box plots para la cuantificación del número de puntos del Fr1 por célula en presencia/ausencia de Hsp104. ***=p-valor<0.001 para un t-test para datos desapareados. Los datos pertenecen a 3 experimentos independientes con un total de 210 células cuantificadas.

La localización punteada y la distinta dinámica de los puntos del Fr1 sugerían que esta quimera podría estarse agregando. De acuerdo con esto veíamos que al sobreexpresar la quimera los puntos aumentaban su diámetro (**Figura 36A**). Algo similar observamos en experimentos de BN-Page, en los que puede verse como la sobreexpresión (pRS426::Fr1-GFP) del fragmento incrementaba su estado de agregación, caracterizado por la mayor proporción de las bandas de tamaño superior (**Figura 36B**, Ag). La chaperona Hsp104 de levaduras desempeña un papel en la desagregación de agregados de proteínas permitiendo su solubilización y replegamiento (Glover & Lindquist, 1998), siendo especialmente importante en condiciones de estrés térmico. Considerando la función de esta chaperona, nos propusimos analizar si Hsp104 podía estar mediando la disolución de los agregados del Fr1. Como se muestra en la **Figura 36B** hay un aumento considerable en la agregación de la proteína en el mutante *hsp104Δ*, indicativo del papel de dicha chaperona en la desagregación

Los resultados presentados indicarían que el dominio luminal es estrictamente necesario para la salida del RE de la proteína constituyendo un degrón de tipo ERAD-L si no se encuentra glicosilado o si se encuentra eliminado prácticamente en su totalidad. La región conformada por los dominios TM de la proteína constituye en sí misma un degrón de tipo ERAD-M cuando esta no se pliega correctamente. Al correcto plegamiento de esta región contribuiría también, en el caso de los 4 últimos dominios TM, la palmitoilación de la proteína por Pfa4. El dominio citosólico central parece asimismo esencial para la salida del RE y el plegamiento de la proteína constituyendo un degrón de tipo ERAD-C cuando este se encuentra desplegado. En cuanto a los complejos E3 implicados en el reconocimiento de cada una de estas regiones cuando se encuentran desplegadas, se puede decir que Hrd1 parece estar monitorizando cualquier defecto en la región luminal de la proteína, Doa10 en la región citosólica central y el complejo Asi en los dominios TM.

Hasta donde sabemos el dominio citosólico C-terminal no tendría ningún papel en el QC en el RE, sin embargo, el dominio citosólico N-terminal puede afectar a este control ya que media la oligomerización de la proteína (Sacristan et al., 2013), proceso que parece ser monitorizado en el cis-Golgi y en el que ahondaremos en el siguiente capítulo de Resultados.

El dominio luminal actuaría como una señal de QC en sí misma, de forma independiente a otras señales de la proteína, aunque el comportamiento de las demás señales estaría asociado al plegamiento de la proteína completa, por lo que se verán también afectadas por el estado de plegamiento de este dominio luminal.

El papel de la chaperona Chs7 en estos procesos de QC parece indirecto y tendría que ver con su efecto en la salida del RE de Chs3 más que con mediar el acceso a ERAD/INMAD de la proteína.

El papel de estas regiones y/o señales será discutido posteriormente, en más detalle y en el contexto general del trabajo, en el apartado de Discusión General.

CAPÍTULO II:
LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO
Chs3-Chs7 Y LA PROPIA
OLIGOMERIZACIÓN DE Chs3
REGULAN SU TRÁFICO A LO
LARGO DE LA RUTA SECRETORA

1. ANÁLISIS PRELIMINAR DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.

En el capítulo I habíamos mostrado como, a diferencia del resto de quimeras y de la proteína silvestre, la quimera carente de los 126 primeros aminoácidos de Chs3, Δ^{126} Chs3, se localizaba en la vacuola además de en el RE en ausencia de la chaperona Chs7, sin pasar aparentemente por la MP (**Figura 38A**). Al sobreexpresar *CHS7*, la quimera volvía a recuperar su vía de tráfico WT, reduciéndose significativamente su acumulación en la vacuola, lo que sugería que existía una vía de tráfico directo a la vacuola de esta quimera ligada a su retención en el RE en el mutante *chs7* Δ . Trabajo previo con esta quimera había demostrado que era funcional, alcanzando la MP, aunque presentaba defectos en su reconocimiento por el retrómero (Arcones et al., 2016) y en endocitosis y oligomerización (Sacristan et al., 2013). Además, se había demostrado que dicho defecto en la oligomerización de la quimera conducía a una acumulación de la proteína en el RE debida a su tráfico retrógrado desde el cis-Golgi en vesículas COPI (Sacristan et al., 2013). Sin embargo, nunca se había examinado el papel de Chs7 en el tráfico de esta quimera al asumirse que esta quedaría totalmente retenida en el RE en el mutante *chs7* Δ como así ocurría con la proteína silvestre (Trilla et al., 1999; **Figura 38A**, centro).

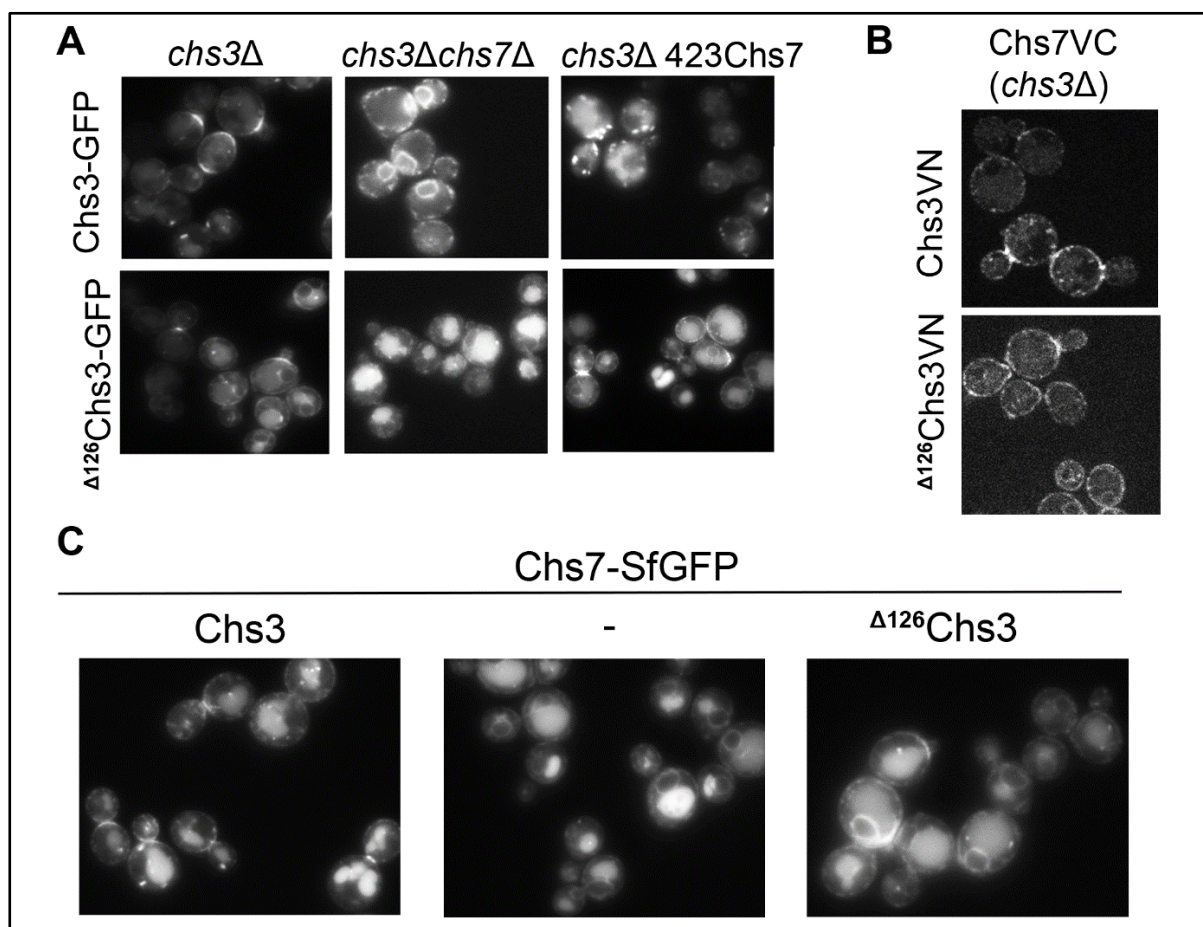


Figura 38. A) Localización de Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3-GFP en cepas *chs3* Δ con niveles WT de Chs7, en ausencia de Chs7 y con Chs7 sobreexpresada (pRS423). B) BiFC entre Chs7VC y Chs3/ Δ^{126} Chs3VN en una cepa *chs3* Δ . C) Localización de Chs7-SfGFP en función de la presencia de Chs3, Δ^{126} Chs3 o en ausencia de estas (-).

Recientemente se ha demostrado que Chs3 y la chaperona Chs7 forman un complejo, siguiendo Chs7 la ruta secretora unida a Chs3 (Dharwada et al., 2018). Nuestros resultados confirman esta evidencia ya que Chs7-SfGFP mostró una localización idéntica a la de las proteínas Chs3 y Δ^{126} Chs3 (**Figura 38C**), indicativo de un tráfico conjunto de Chs7 con estas proteínas; además Chs7 interaccionaba con estas proteínas en experimentos de BiFC (**Figura 38B**). Sin embargo, en ausencia de Chs3, Chs7-SfGFP se localizaba no solamente en el RE, sino también en la vacuola, no alcanzando aparentemente la MP (**Figura 38C**, centro), lo que sugería la existencia de una vía directa de tráfico a la vacuola de esta proteína que sería independiente de Chs3.

El hecho de que Chs7 forme un complejo con Chs3 y Δ^{126} Chs3, pero que tanto Chs7 como la quimera Δ^{126} Chs3 puedan alcanzar la vacuola de forma independiente la una de la otra, nos hizo plantearnos la caracterización de estas vías alternativas a la vacuola. En el caso de la quimera Δ^{126} Chs3 además pretendíamos analizar las razones por las que esta quimera, a diferencia de la proteína silvestre, puede seguir esta vía en ausencia de la chaperona.

Con este objetivo analizamos primero las regiones de Chs3 que podrían estar implicadas en este tráfico, para después explorar la estabilidad de la chaperona Chs7 en una librería de mutantes en la ruta UPS y en la colección completa de mutantes KO (Knock Out) marcando esta con el tándem fluorescente mCherry-SfGFP.

1.1. Análisis del dominio N-terminal de Chs3 en la ruta de tráfico directo a la vacuola.

Para tratar de determinar la región de Chs3 implicada en el tráfico a través de esa ruta alternativa a la vacuola en el mutante *chs7* Δ , decidimos estudiar la localización de quimeras con distintas deleciones en el extremo N-terminal de Chs3, las cuales eran funcionales y se habían construido previamente con otros objetivos (Sacristan et al., 2013). En los experimentos de microscopía realizados para analizar dicha localización incluimos también como controles a la proteína silvestre (Chs3) y a la quimera en el C-terminal de la proteína, Chs3 Δ^{37} .

De acuerdo con la microscopía, en presencia de Chs7 (**Figura 39**, columna izquierda) Chs3 y todas sus quimeras con deleciones en el N-terminal alcanzaban la MP presentando una localización similar. La quimera Chs3 Δ^{37} -GFP se localizaba principalmente en puntos intracelulares, lo que estaba de acuerdo con su retención en el TGN/EE debida a sus defectos de interacción con el exómero (Rockenbauch et al., 2012).

En el mutante *chs7* Δ (**Figura 39**, columna derecha), observábamos como las quimeras Δ^{63} Chs3 y Δ^{63-125} Chs3 quedaban totalmente retenidas en el RE sin llegar a la vacuola, al igual que Chs3 y Chs3 Δ^{37} . Sin embargo, si se eliminaban los 126 primeros aminoácidos, Δ^{126} Chs3, o regiones que incluyesen a los aminoácidos a izquierda y derecha del aminoácido 63, caso de las quimeras Δ^{15-140} Chs3 o Δ^{26-125} Chs3, las proteínas se acumulaban en la vacuola, sin observarse localización alguna en la MP.

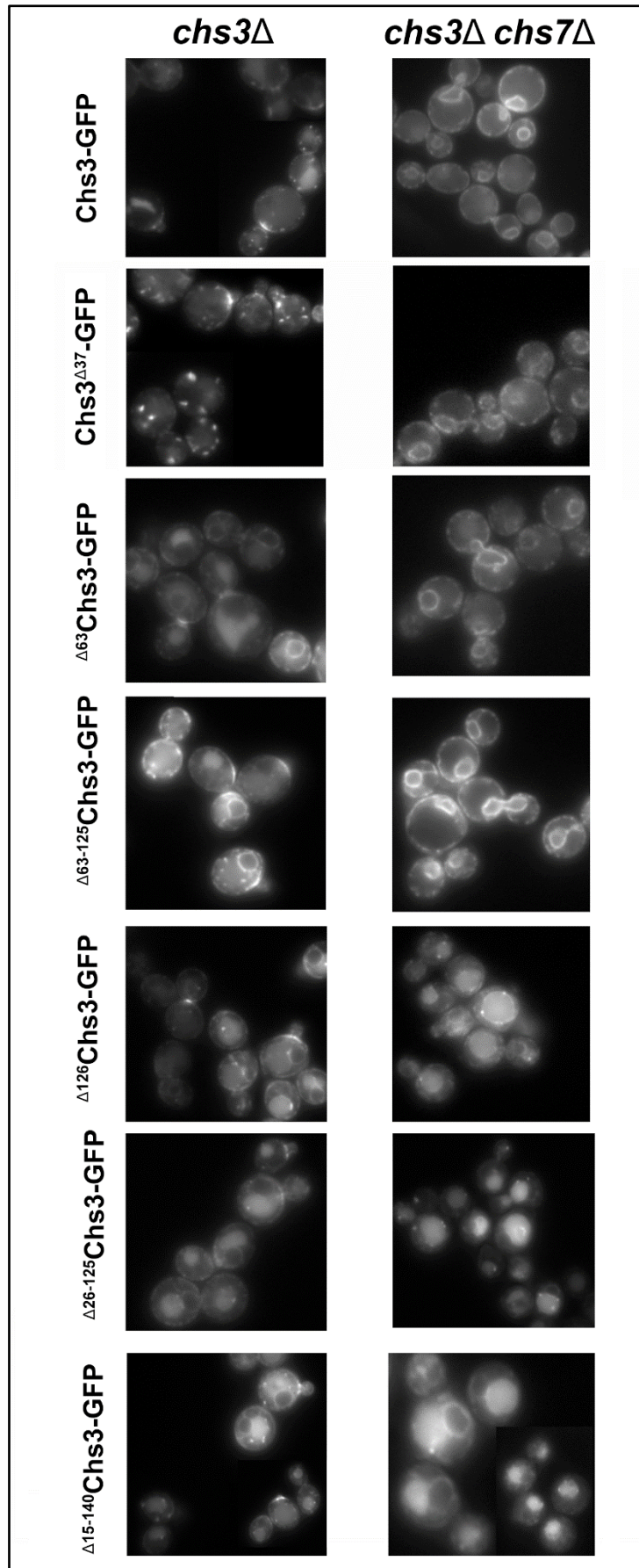


Figura 39. Análisis de localización de las quimeras del N-terminal de Chs3, Chs3 y Chs3^{Δ37} marcadas con GFP (plásmidos pRS315) en función de la presencia/ausencia de Chs7.

Del conjunto de estos resultados se deduce que la región comprendida entre los aminoácidos 26 a 125 de Chs3 promueve la retención en el RE de la proteína en ausencia de Chs7, lo que dado el papel de esta misma región en la oligomerización de Chs3 (Sacristan et al., 2013) indicaría que es dicha oligomerización la que directa o indirectamente previene la salida de esta proteína del RE en ausencia de su chaperona.

1.2. Búsqueda masiva para el análisis del tráfico y del QC de Chs7 en función de la formación del complejo Chs3-Chs7.

De la misma manera que se había mostrado en el capítulo I para Chs3 y sus quimeras, se decidió llevar a cabo una búsqueda masiva para analizar la degradación de Chs7. Para ello marcamos la chaperona con el tándem fluorescente mCherry-SfGFP tanto en una cepa WT como en un mutante *chs3Δ* con el objetivo de identificar genes implicados en la degradación de Chs7 en ambas condiciones y así poder establecer diferencias entre la vía que sigue Chs7 cuando está unida a Chs3 y la que se da en su ausencia. Incluimos en este análisis también a la versión mutante Chs7^{Δ22} al haberse propuesto que la región de los últimos 22 aminoácidos de Chs7 media la interacción de Chs7 con Chs3 (Dharwada et al., 2018). Dicha búsqueda se realizó cruzando nuestras cepas marcadas con la librería de mutantes en la ruta UPS y con la de mutantes KO (Kong et al., 2021; Winzeler et al., 1999). Es importante señalar aquí que el procedimiento con la librería KO ofreció problemas experimentales, por lo que obtuvimos resultados parciales presentándose aquí solo los más relevantes para el análisis (**Figura 40B**).

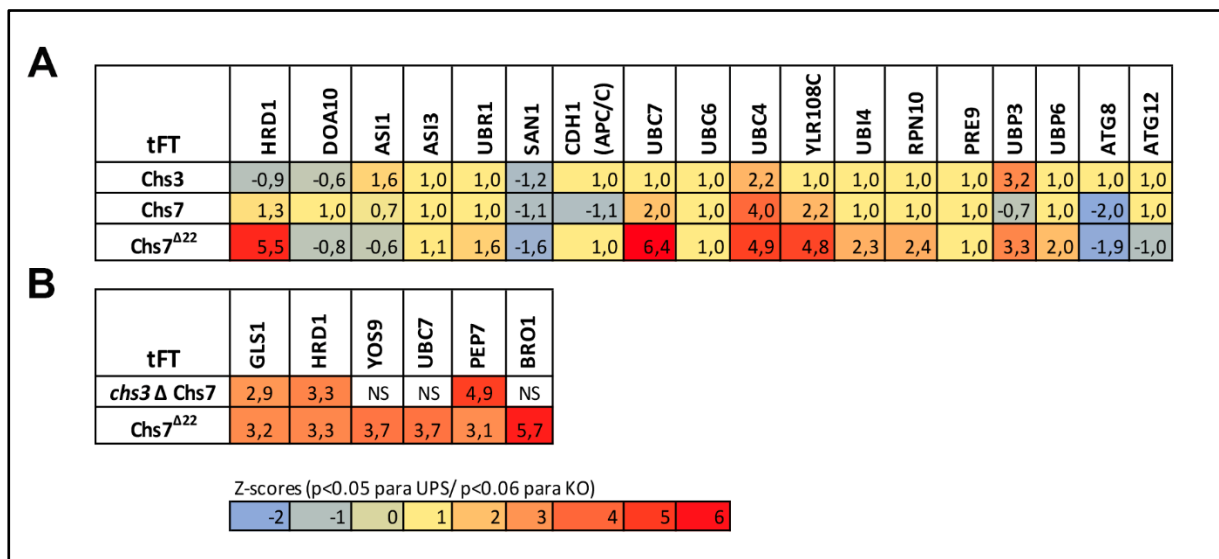


Figura 40. A) Z-scores de las ratios de intensidades mCherry/SfGFP para la búsqueda masiva realizada con la librería de la UPS. B) Z-scores de las ratios de intensidades mCherry/SfGFP para la búsqueda masiva realizada con la librería KO. NS= Dato no significativo.

Los resultados más representativos obtenidos se recogen en la **Figura 40**, y de ellos puede deducirse:

1. Ni Chs3 ni Chs7 en condiciones WT son sustratos del proteasoma (genes *RPN10* y *PRE9*) o de macroautofagia (genes *ATG8* y *ATG12*) (**Figura 40A**). Además, para la mayor parte de los genes los z-scores son similares para ambas proteínas marcadas con el tándem fluorescente. Esto último estaría de acuerdo con la vía conjunta que siguen ambas proteínas como un complejo en condiciones WT.
2. En ambos análisis se obtenía una clara estabilización de la proteína Chs7^{Δ22}-tFT en los mutantes *hrd1Δ* y *ubc7Δ*, lo que sugería un papel de ERAD y, en concreto, del complejo E3 Hrd1 y la E2 Ubc7 en la degradación de Chs7 cuando esta perdía su interacción con Chs3. Este resultado venía apoyado por el aumento en la estabilización de la proteína que se observaba en el mutante del proteasoma *rpn10Δ*.
3. Los resultados de la búsqueda masiva realizada con la librería KO (**Figura 40B**) sugieren que Chs7 en ausencia de Chs3 es dirigida a ERAD-L de glicoproteínas puesto que se detecta una estabilización de esta proteína en los mutantes de *Gls1*, *Yos9*, *Ubc7* y *Hrd1*, todas ellas proteínas típicas de este tipo de ERAD. Para confirmar este punto analizamos experimentalmente la degradación de Chs7-tFT (*chs3Δ*) en el mutante *yos9Δ*, detectándose un aumento en los niveles de la proteína y una reducción en la intensidad de la banda de procesamiento proteasomal en dicho mutante (**Figura A3**, Anexo), lo que sugería el papel de la glicosilación de Chs7 (Poljak et al., 2018) en la regulación del reconocimiento por ERAD de la proteína.
4. La estabilización tanto de la proteína Chs7^{Δ22}-tFT como de Chs7-tFT (*chs3Δ*) en mutantes de genes implicados en el procesamiento en la vacuola como *PEP7* y *BRO1* (**Figura 40B**) sugería que en ausencia de Chs3 la chaperona Chs7 estaba accediendo a la vacuola, de acuerdo con lo que nosotros observábamos por microscopía. Pep7 parece tener un papel general participando en el anclaje y fusión de vesículas derivadas del TGN con los endosomas (Webb et al., 1997; Srivastava et al., 2000), mientras que Bro1 participa en los pasos finales de la ruta del MVB (Luhtala & Odorizzi, 2004). Así, la estabilización observada en estos mutantes indicaría que Chs7 en ausencia de Chs3 es dirigida desde el TGN a la vacuola para ser procesada de forma definitiva por la ruta del MVB.

2. ANÁLISIS DEL TRÁFICO INDEPENDIENTE A LA VACUOLA DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.

En base a los resultados preliminares obtenidos para Chs7 y Δ^{126} Chs3 en los apartados anteriores, nos propusimos determinar cuál era la vía o vías de tráfico a la vacuola que estas proteínas seguían cuando no formaban el correspondiente complejo. Para ello decidimos explorar las distintas vías descritas hasta el momento para el transporte de proteínas a la vacuola, entre ellas la reticulofagia y las múltiples vías directas para el tráfico desde el TGN a la vacuola, incluyendo la ruta CPY y la ruta AP-3, ya que asumíamos inicialmente que estas proteínas no pasaban por la MP, lo que descartaba la vía endocítica descrita para Chs3 (Arcones et al., 2016).

2.1. Análisis de la vía autofágica.

Una de las hipótesis más factibles como consecuencia de la acumulación parcial de estas proteínas en el RE (además de en la vacuola) era la de que estas estaban siendo dirigidas a la vacuola directamente desde el RE por reticulofagia. Al igual que para la autofagia general, dentro de la reticulofagia podíamos distinguir dos tipos principales: macroreticulofagia y microreticulofagia. La macroreticulofagia requiere del núcleo de genes ATG para producirse por lo que para confirmar o descartar el papel de esta vía lo que hicimos fue analizar el comportamiento de estas proteínas en un mutante *atg1 Δ* . *ATG1* es uno de los genes que inicia la cascada autofágica, de manera que en su ausencia si nuestras proteínas siguiesen este camino deberíamos ver un bloqueo de su procesamiento en la vacuola por Western Blot desapareciendo como resultado la banda de GFP o SfGFP libre situada en torno a los 28kDa.

Al realizar estos experimentos observamos que mientras la proteína control, Atg8-yeGFP, era un claro sustrato de autofagia apareciendo la banda de GFP libre al añadir rapamicina y desapareciendo en el mutante *atg1 Δ* (**Figura 41A**), esto no ocurría en el caso de nuestras proteínas donde la banda de GFP/ SfGFP resultado del procesamiento de estas en la vacuola se mantenía independientemente de la presencia de Atg1 (**Figura 41B y C**).

Recientemente se ha demostrado que el complejo ESCRT es necesario para la escisión de la membrana vacuolar durante la microreticulofagia (revisado en Schuck, 2020). El papel de este complejo será revisado más adelante en este análisis (punto 2.4). Sin embargo, para que esta vía tenga lugar tendríamos que asumir que la acumulación de estas proteínas (Chs7 y Δ^{126} Chs3) genera algún tipo de estrés en el RE, lo que no hemos sido capaces de observar al no detectar inducción alguna de la respuesta UPR ante su acumulación (resultados no mostrados), por lo que en principio debemos descartar esta vía.

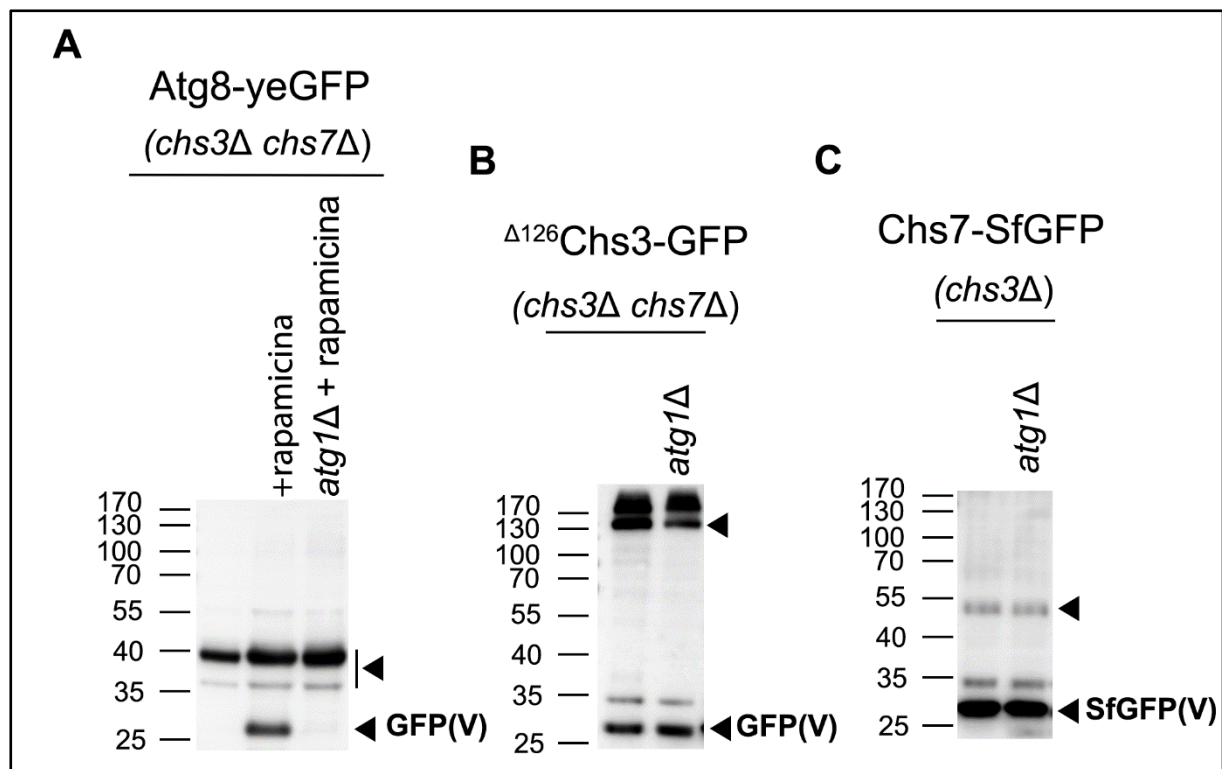


Figura 41. Papel de Atg1 en el procesamiento vacuolar de Atg8-yeGFP (A), la quimera Δ^{126} Chs3-GFP (B) y Chs7-SfGFP (C) en las cepas correspondientes y en las condiciones indicadas. Los triángulos superiores indican las bandas de la proteína sin procesar (Atg8 presenta 2 bandas al tener un procesamiento extra) y los inferiores marcan las bandas de GFP/SfGFP libre.

Del conjunto de estos resultados se infiere que ni Chs7 (*chs3Δ*) ni Δ^{126} Chs3 (*chs3Δ chs7Δ*) parecen acceder a la vacuola por la vía autofágica, lo que nos lleva a plantearnos como hipótesis más factible que estas proteínas pudieran salir independientemente del RE y una vez en el Golgi siguiesen una ruta u otra desde el TGN/EE para alcanzar la vacuola.

2.2. Chs7 y la quimera Δ^{126} Chs3 no alcanzan la vacuola por medio del complejo AP-3 o la ruta CPY.

Las vías típicas de transporte directo a la vacuola que parten desde el TGN/EE son la vía mediada por el complejo AP-3 y la denominada ruta CPY. La ruta AP-3 implica la formación de vesículas que se fusionan directamente con la vacuola, mientras que la ruta CPY está mediada por el receptor Vps10 y los adaptadores GGAs que dirigen el tráfico endosomal de proteínas en vesículas recubiertas de clatrina hasta el PVC donde por último la ruta del cuerpo multivesicular se encargará del reconocimiento e internalización de las correspondientes proteínas a la vacuola para su degradación.

Para comprobar si alguna de estas vías era la responsable del transporte a la vacuola de nuestras proteínas analizamos el tráfico de estas en los mutantes *apl6Δ* (*Apl6* es una subunidad del complejo AP-3) y *vps10Δ*. En la microscopía de fluorescencia se observa como ni la quimera Δ^{126} Chs3-GFP (*chs7Δ*) ni Chs7-SfGFP (*chs3Δ*) dejan de localizarse en la vacuola en los mutantes carentes de *APL6* o *VPS10*, presentando una localización prácticamente indistinguible de la observada en las estirpes WT (**Figura 42**). Adicionalmente, la banda de

GFP/SfGFP libre que se detectaba en los Western Blots como consecuencia del procesamiento de nuestras proteínas en la vacuola, era idéntica en los citados mutantes y en el WT (no mostrado).

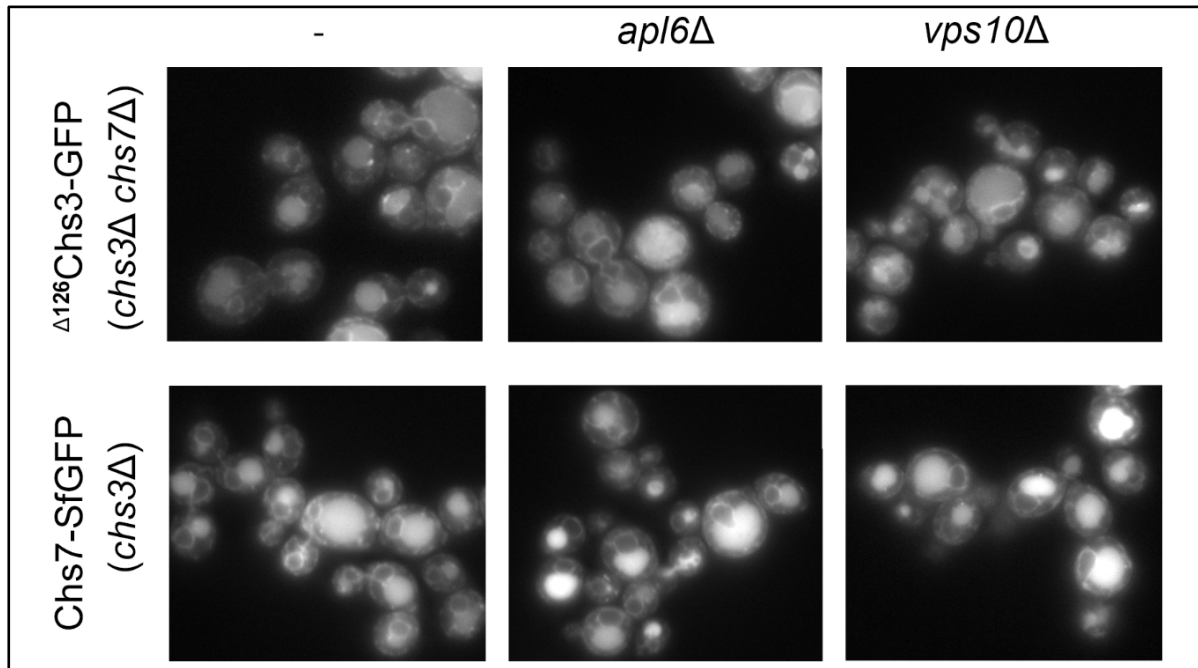


Figura 42. Localización de la quimera Δ^{126} Chs3-GFP y de Chs7-SfGFP en las cepas control indicadas y en los mutantes *apl6Δ* y *vps10Δ*.

2.3. El tráfico independiente a la vacuola de Chs7 y Δ^{126} Chs3 no pasa por la MP.

Tomando en consideración que en condiciones WT (*CHS7*) una parte de Chs3 y la quimera Δ^{126} Chs3 se endocita tras su paso por la MP y sigue la ruta del MVB para degradarse en la vacuola (Arcones et al., 2016), Chs7 también debía de estar haciéndolo al encontrarse asociada a estas proteínas. Por lo tanto, era posible que tanto Chs7 como la quimera Δ^{126} Chs3, incluso cuando no estaban formando un complejo, estuviesen pasando por la MP y endocitándose hasta ser dirigidas a la vacuola. Si bien en la microscopía de fluorescencia no parecía que ni Chs7-SfGFP en ausencia de Chs3 ni la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en el mutante de la chaperona estuviesen alcanzando la MP puesto que no veíamos localización alguna en el cuello (**Figura 42**, columna izquierda), decidimos analizar más a fondo si esto estaba ocurriendo o no. Para esto llevamos a cabo experimentos de microscopía tratando nuestras células con latrunculina A, una droga que inhibe la endocitosis al bloquear la polimerización de la actina, de manera que si nuestras proteínas pasasen por la MP para después endocitarse entonces ante el tratamiento con la droga las veríamos acumuladas en este compartimento y además se reduciría su señal en la vacuola.

En dichos experimentos detectamos claramente como en condiciones WT tanto Chs3-GFP (control) como Δ^{126} Chs3-GFP y Chs7-SfGFP (*CHS3*) se acumulan en la MP tras el tratamiento con latrunculina A durante 60 minutos (**Figura 43A**). Esto está de acuerdo con la localización observada previamente para estas proteínas en el cuello (MP) en el complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7. No ocurría lo mismo para Δ^{126} Chs3-GFP y Chs7-SfGFP cuando estas

no formaban el correspondiente complejo ya que en este caso no llegábamos nunca a visualizar a estas proteínas a lo largo de la MP tras el tratamiento con latrunculina durante 60 minutos (**Figura 43B**).

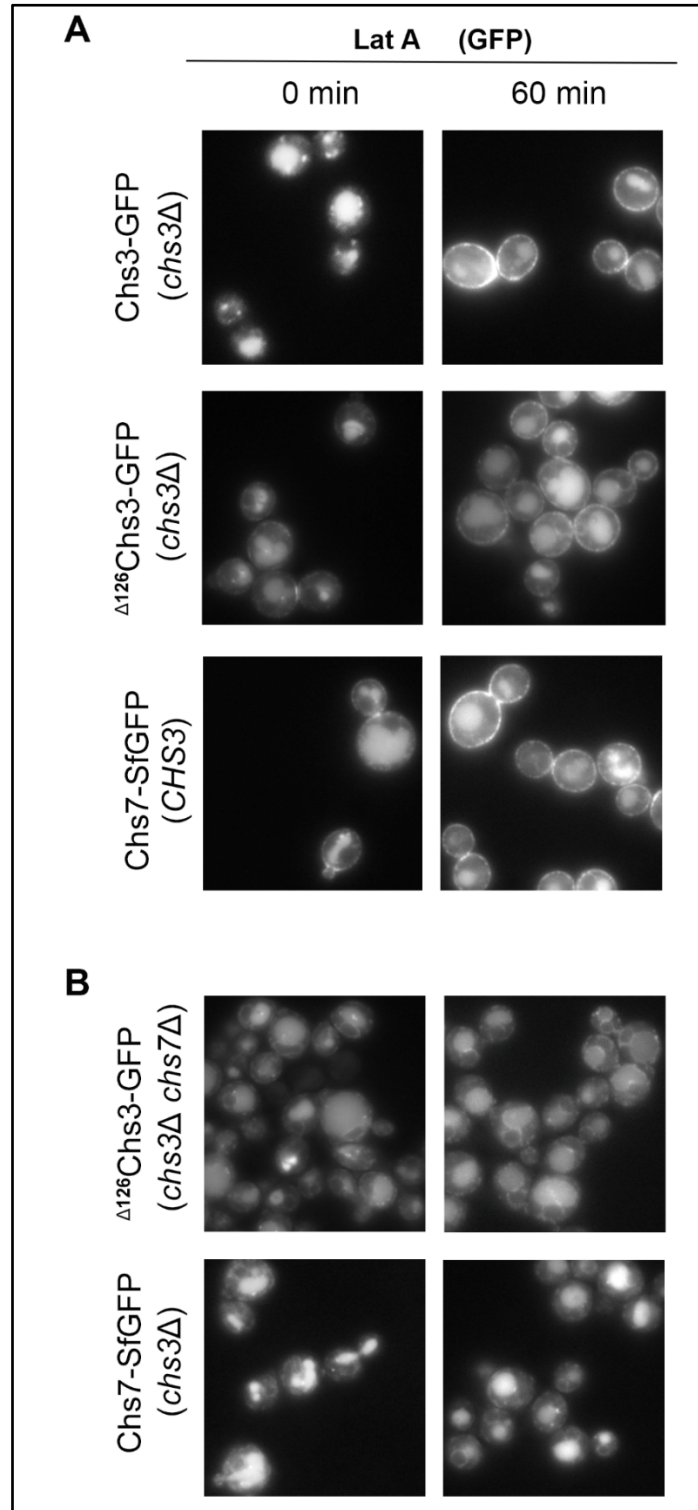


Figura 43. A) Localización de Chs3-GFP, Δ^{126} Chs3-GFP y Chs7-SfGFP en las cepas indicadas tratadas con latrunculina A. B) Localización de Δ^{126} Chs3-GFP y de Chs7-SfGFP en las cepas indicadas tratadas con latrunculina A. Se presenta el tiempo 0 (nada más añadir la droga) y el de 60 minutos tras el tratamiento.

De estos resultados se infiere que la formación del complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7 es imprescindible para el paso por la MP de estas proteínas, de manera que cuando el complejo no se forma tanto Chs7 como Δ^{126} Chs3 acceden a la vacuola en vías alternativas que no implican su paso previo por la MP y, por lo tanto, no se corresponden con la ruta endocítica.

2.4. La vía alternativa a la vacuola que siguen Chs7 y la quimera Δ^{126} Chs3 cuando no se forma el complejo Chs7-Chs3/ Δ^{126} Chs3 es dependiente del ESCRT.

Por último, decidimos analizar si la entrada en la vacuola de Chs7-SfGFP (*chs3 Δ*) y Δ^{126} Chs3-GFP (*chs7 Δ*) se producía a través de la ruta del cuerpo multivesicular (MVB), es decir, si era dependiente del complejo ESCRT a pesar de que estas no pasaran por la MP ni siguiesen la ruta CPY. Para ello estudiamos el tráfico de estas proteínas en el mutante del ESCRT-0 *vps27 Δ* . En este mutante las proteínas que siguen dicha vía se acumulan en la membrana de la vacuola y en el compartimento denominado endosoma E, estructura vesicular agrandada y aberrante generada por el colapso de los endosomas (Piper et al., 1995).

En la **Figura 44** puede verse como en el mutante *vps27 Δ* las proteínas Chs7-SfGFP y Δ^{126} Chs3-GFP en condiciones WT se acumulan en parte en el endosoma E, previniéndose parcialmente su llegada al lumen vacuolar. Sin embargo, en sus vías de tráfico independiente tanto Chs7-SfGFP (*chs3 Δ*) como Δ^{126} Chs3-GFP (*chs7 Δ*) en el mutante *vps27 Δ* mostraban un endosoma E fuertemente teñido, además de una significativa reducción de la señal vacuolar, limitada en todos los casos a la membrana de la vacuola, lo que indicaba una fuerte acumulación de estas proteínas en el endosoma E.

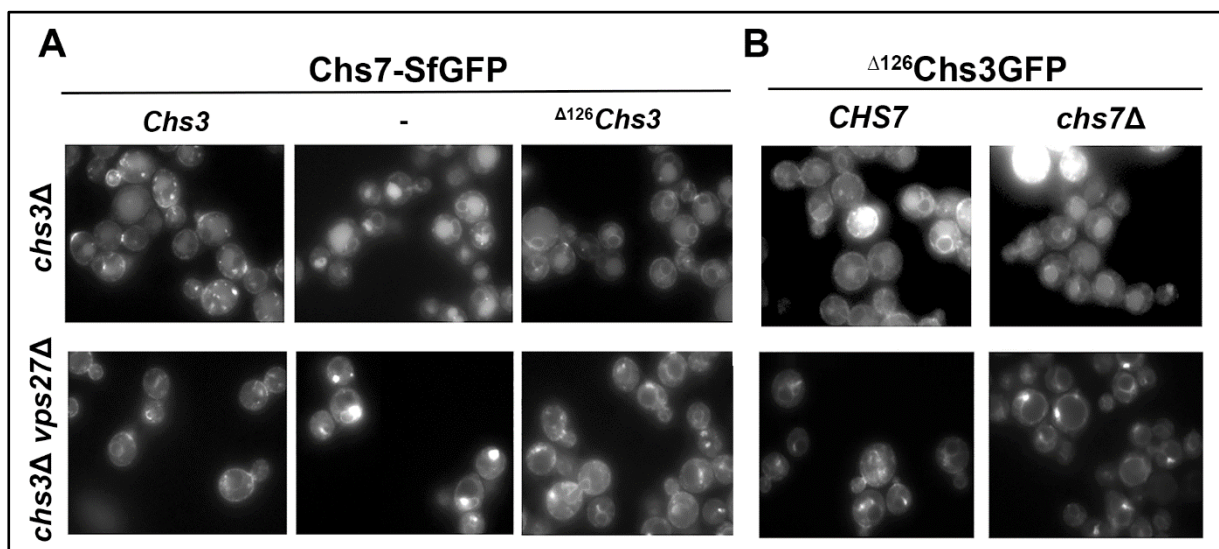


Figura 44. A) Localización de Chs7-SfGFP en cepas *chs3 Δ* y *chs3 Δ vps27 Δ* a las que se ha introducido un plásmido centromérico vacío (-), con Chs3 o la quimera Δ^{126} Chs3. B) Localización de la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en las cepas *chs3 Δ* y *chs3 Δ vps27 Δ* (*CHS7/chs7 Δ*). Nótese las diferencias en la intensidad de la tinción del endosoma E.

Estos resultados ponen de manifiesto que el tráfico independiente a la vacuola de Chs7 y Δ^{126} Chs3 se encuentra considerablemente bloqueado en el mutante *vps27 Δ* y, por lo tanto,

precisa del ESCRT para completarse, lo que a su vez apunta a que dicho tráfico sucede a través de la vía endosomal, de forma similar a lo descrito para la proteína silvestre Chs3 que es endocitada desde la MP (Arcones et al., 2016).

Es importante destacar aquí las diferencias significativas observadas en la acumulación de estas proteínas en el endosoma E en función de si se producía o no la formación del correspondiente complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7. Así, la acumulación en el endosoma E de Chs7 y Δ^{126} Chs3 era muy superior cuando estas viajaban independientemente sin formar un complejo, lo que sugería que la cantidad de proteína que llegaba a la vacuola por estas vías era mucho mayor a la que llegaba vía endocitosis cuando se formaba el complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7. Observábamos también una mayor acumulación en el endosoma E de la proteína Chs7 que de la proteína Δ^{126} Chs3 en sus rutas de tráfico independiente a la vacuola, indicativo de ciertas diferencias en estas vías alternativas de transporte. El complejo Δ^{126} Chs3-Chs7 se acumulaba asimismo ligeramente más en el endosoma E que el complejo Chs3-Chs7, lo que denotaría ciertas diferencias cuantitativas en el tráfico de estos (**Figura 44A**).

Resultados similares se obtuvieron cuando analizamos el comportamiento de estas proteínas mediante Western Blot, ya que en todos los casos en el mutante *vps27* Δ se prevenía la aparición de la banda de GFP/SfGFP (**Figura 45**), lo que indicaba un bloqueo en el tráfico de estas proteínas a la vacuola. En estos experimentos también se puede observar que la banda de degradación en la vacuola de estas proteínas es siempre mayor al formarse el complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7, lo que sugiere que el tráfico hacia la vacuola de estas proteínas se incrementa en esa situación. Este último resultado y los comentados más arriba sugieren que Chs7 y Δ^{126} Chs3 presentan defectos en su reconocimiento por el ESCRT en su tráfico independiente a la vacuola.

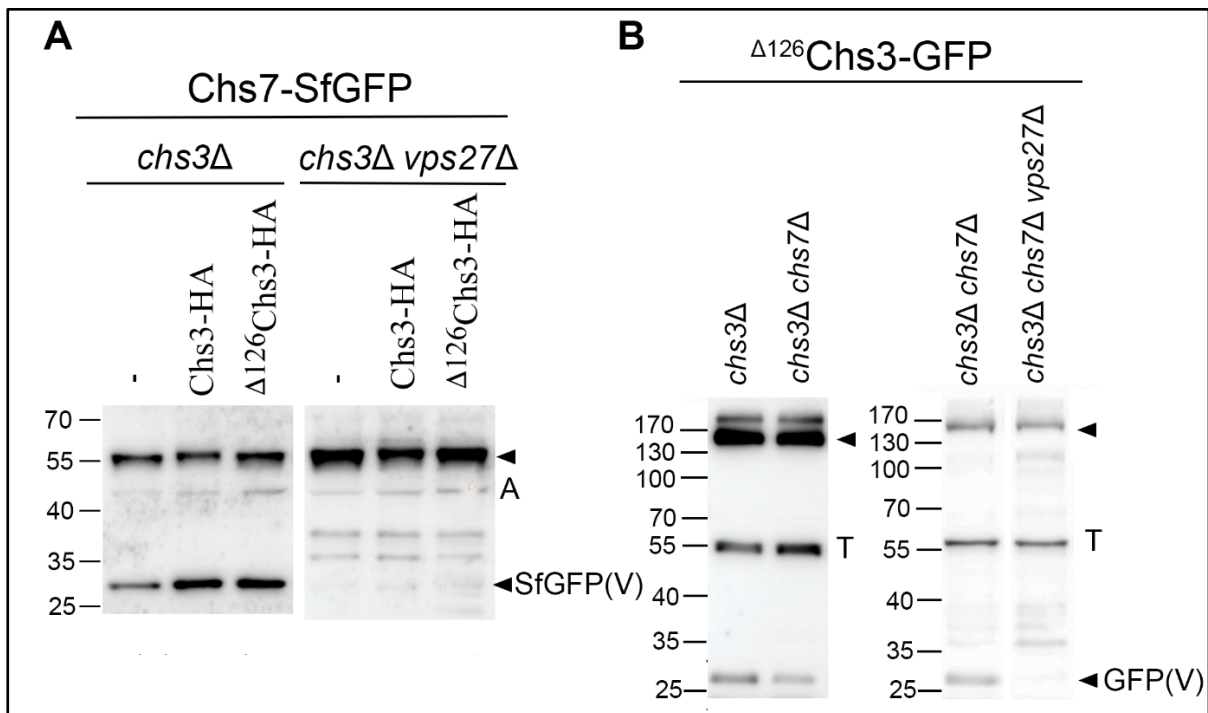


Figura 45. A) Western Blots para Chs7-SfGFP en las cepas *chs3* Δ y *chs3* Δ *vps27* Δ en presencia de Chs3/ Δ^{126} Chs3 o ninguna de ellas (-). A= Actina. B) Western Blots de Δ^{126} Chs3-GFP en cepas *CHS7/chs7* Δ (*chs3* Δ) y papel en su procesamiento de *VPS27* en ausencia de Chs7. T= Tubulina.

Como conclusión, y de acuerdo con los resultados presentados en esta exploración inicial, podemos decir que en ausencia de la formación del complejo Chs7-Chs3/ Δ^{126} Chs3 tanto Chs7 como la quimera Δ^{126} Chs3 parecían ser fuertemente direccionadas a la vacuola desde el TGN/EE en vías alternativas que no se correspondían ni con la reticulofagia ni con la ruta mediada por AP-3 o la ruta CPY y que además tampoco implicaban el paso de estas proteínas por la MP. Teniendo en cuenta que el reservorio general de todas estas proteínas es el TGN/EE, debemos especular con la existencia de un mecanismo que reconozca de forma más eficiente a estas proteínas cuando se encuentran aisladas en este compartimento. Este reconocimiento puede ser complejo debido a la interacción competitiva entre el exómero y el complejo AP-1 por Chs3 en el TGN/EE (Anton-Plagaro et al., 2021). A mayores debemos considerar el elevado grado de ubiquitinación que presenta Chs3 puesto que esta modificación postraduccional podría estar regulando todas estas interacciones. Desconocemos como todo esto se imbricaría con la formación del correspondiente complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7.

3. ANÁLISIS DE LA SALIDA DEL RE DE Chs7 Y LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.

Una vez visto que nuestras proteínas, Chs7 y la quimera Δ^{126} Chs3, cuando no formaban el complejo Chs7-Chs3/ Δ^{126} Chs3 seguían una ruta alternativa que culminaba en la ruta del MVB sin pasar por la MP, era evidente que estas proteínas estaban saliendo del RE hasta el complejo de Golgi. Por lo tanto, nos propusimos analizar si su salida independiente del RE era similar a la que se producía en condiciones silvestres, teniendo en cuenta que la proteína Chs3 no era capaz de salir del RE cuando se encontraba aislada (*chs7 Δ*).

3.1. Chs7 y Δ^{126} Chs3 salen del RE en vesículas COPII.

Primeramente, examinamos el papel de las vesículas COPII en la salida del RE de nuestras proteínas usando para ello los mutantes termosensibles *sec23* (COPII, cubierta interna) y *sec31-1* (COPII, cubierta externa), en los que se analizó el tráfico de las distintas proteínas después de incrementar la temperatura y de inhibir además su síntesis *de novo* en el caso de las cinéticas con cicloheximida realizadas. En estos experimentos se utilizó la proteína Chs3 como control.

En la observación microscópica (no mostrada) se detectó a partir de los 30 minutos del choque térmico una mayor retención en el RE de nuestras proteínas y de Chs3 en los mutantes *sec23* y *sec31-1*, indicativo del bloqueo en su salida del RE. A mayores se determinaron las ratios entre la cantidad de proteína procesada en la vacuola (banda de GFP/SfGFP libre, 28kDa) y la cantidad de proteína sin degradar, a partir de los datos recogidos de la realización de cinéticas con cicloheximida. Los resultados de esta cuantificación a los 60 minutos del choque térmico y de la inhibición de la síntesis proteica se muestran en la **Figura 46**. En los tres casos, Chs3-GFP, Chs7-SfGFP y Δ^{126} Chs3-GFP, se puede ver como las ratios de degradación de estas proteínas en la vacuola son significativamente inferiores en los mutantes *sec23* y *sec31-1* si se comparan con el

correspondiente control, lo que apunta a un significativo bloqueo en la degradación vacuolar de estas proteínas asociado a su menor salida del RE.

Un dato para destacar en los resultados de dicho cálculo es la significativamente superior ratio de degradación de la proteína Δ^{126} Chs3 en *chs7\Delta* (**Figura 46C**), que casi triplica a la de Chs3 y Chs7, indicativo de un transporte especialmente intenso de ésta a la vacuola en su tráfico independiente hacia este compartimento. La proteína Δ^{126} Chs3 en condiciones WT (*CHS7*) también ve bloqueado su tráfico en estos mutantes de COPII, de forma similar a Chs3 (datos no presentados).

Con estos resultados podemos decir que las proteínas Δ^{126} Chs3 y Chs7 salen del RE en vesículas COPII se encuentren o no formando un complejo, cosa contraria a lo que ocurría con la proteína silvestre que en ausencia de Chs7 era incapaz de salir del RE quedando retenida en este compartimento (Trilla et al., 1999). Las razones para la salida de la proteína Δ^{126} Chs3 en estas condiciones se abordarán más adelante.

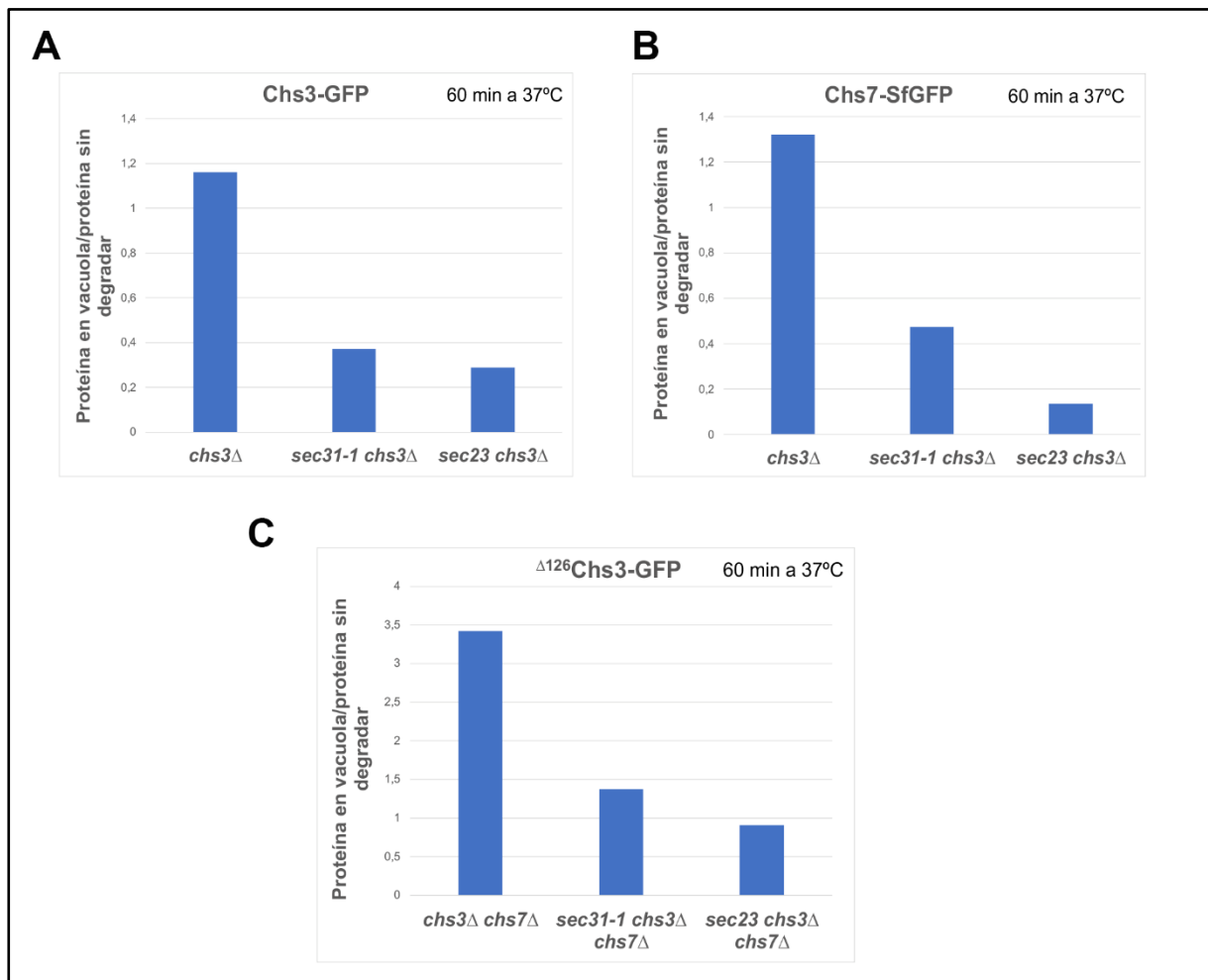


Figura 46. Gráficos de barras representando las ratios de proteína en la vacuola/proteína sin degradar de Chs3-GFP (A), Chs7-SfGFP (B) y la quimera Δ^{126} Chs3-GFP (C) en las cepas control indicadas en cada caso y en los mutantes *sec23* y *sec31-1* a los 60 minutos del choque térmico a 37°C y del tratamiento con cicloheximida.

3.2. El receptor Erv14 es necesario para la salida del RE de Chs7, pero no de Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7.

Se había descrito que la salida de Chs3 del RE era mediada por el receptor Erv14 (Sacristan et al., 2013), por lo que nos propusimos determinar también el papel de este en la salida de nuestras proteínas. En condiciones silvestres Chs7-SfGFP, formando un complejo con Chs3, quedaba considerablemente retenida en el RE en el mutante *erv14* Δ (no mostrado), de la misma manera que lo hacía Chs3 (Sacristan et al., 2013). En el mutante *chs3* Δ , la proteína Chs7-SfGFP en ausencia de Erv14 mostraba una tinción mucho más intensa en el RE, además de una reducción significativa en su señal vacuolar (**Figura 47A**). De acuerdo con esto, la intensidad de la banda de SfGFP libre indicadora del procesamiento vacuolar de la proteína se veía también reducida en el mutante *erv14* Δ (**Figura 47B**). Estos resultados indican que la salida independiente de Chs7 del RE es mediada por la interacción de Chs7 con Erv14, interacción que debe ser independiente de la presencia de Chs3 y, por lo tanto, de la formación del complejo Chs3-Chs7.

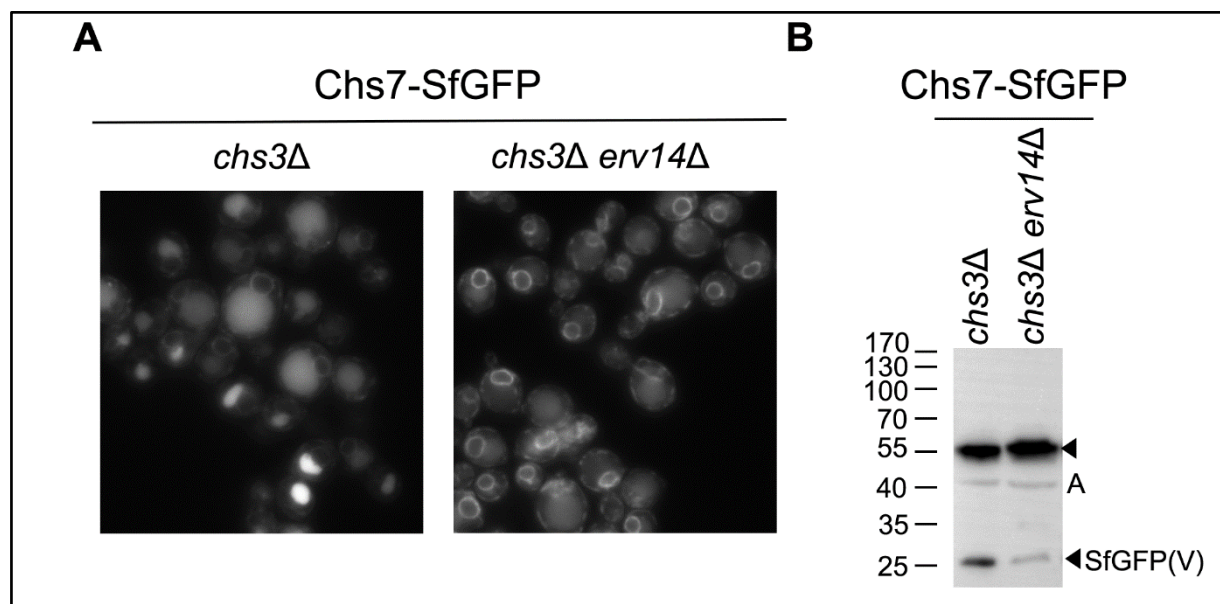


Figura 47. A) Localización de Chs7-SfGFP en *chs3* Δ y *chs3* Δ *erv14* Δ . B) Western Blot de Chs7-SfGFP en *chs3* Δ y *chs3* Δ *erv14* Δ usando actina (A) como control de carga.

El mismo tipo de experimentos se llevaron a cabo para analizar el papel de Erv14 sobre la salida del RE de Δ^{126} Chs3 (**Figura 48**). En condiciones WT (*CHS7*) la ausencia de Erv14 bloquea la salida del RE de Δ^{126} Chs3-GFP como puede observarse por la mayor tinción del RE (**Figura 48A**, paneles superiores), de acuerdo con el bloqueo en la llegada a la vacuola de la proteína que se deducía del reducido procesamiento vacuolar de la proteína en el mutante *erv14* Δ (**Figura 48B**). Sin embargo, en ausencia de Chs7 la localización de Δ^{126} Chs3-GFP es la misma con independencia de la presencia de Erv14 (**Figura 48A**, paneles inferiores) y la degradación vacuolar de la proteína también es muy similar (**Figura 48B**), lo que sugiere que Erv14 no participa en la salida independiente de la proteína Δ^{126} Chs3 del RE. La salida de Δ^{126} Chs3 (*chs7* Δ) del RE con independencia del receptor Erv14 apuntaba a que ésta se produciría por un mecanismo pasivo de tipo *bulk flow*, mecanismo que podría incluso

estar funcionando en la cepa WT como así sugiere la banda de degradación vacuolar residual que observábamos en el mutante *erv14Δ* (*CHS7*).

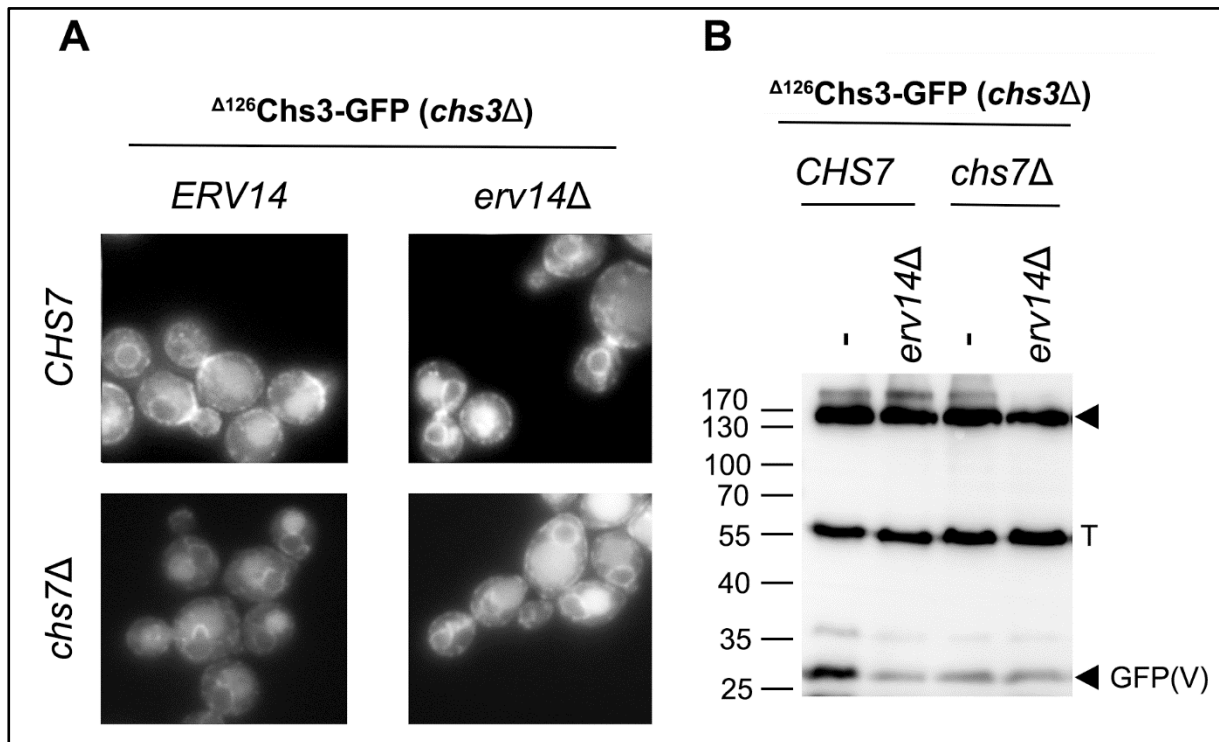


Figura 48. A) Localización de la quimera $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ en cepas *CHS7/chs7Δ* (*chs3Δ*) en función de la presencia de Erv14. B) Western Blot de la proteína $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ en los mutantes de la microscopía de A. T= Tubulina.

De acuerdo con todo lo anterior se debe concluir: (1) Chs7 y Chs3 salen del RE en vesículas COPII, pero a diferencia de Chs3 que requería de Chs7 para su salida de este compartimento de forma dependiente de Erv14, Chs7 era capaz de salir del RE de forma independiente de Chs3 utilizando dicho receptor. Esto último sugería la posibilidad de que Chs7 mediase el reconocimiento, no sabemos si directa o indirectamente, de Chs3 por Erv14. (2) La proteína $\Delta^{126}\text{Chs3}$ sale del RE en vesículas COPII de forma similar a Chs3 en la cepa WT en un proceso dependiente de Erv14. Sin embargo, y a diferencia de la proteína silvestre, en ausencia de la chaperona Chs7 la quimera $\Delta^{126}\text{Chs3}$ era capaz de salir del RE por un mecanismo de *bulk flow* independiente de Erv14.

3.3. La reducida agregación de $\Delta^{126}\text{Chs3}$ en ausencia de Chs7 facilita su salida del RE por *bulk flow*.

En este punto resultaba un tanto desconcertante observar como la proteína $\Delta^{126}\text{Chs3}$, a diferencia de Chs3, era capaz de salir del RE en ausencia de su chaperona. Se desconocen con exactitud los motivos para el colapso de Chs3 en el RE en el mutante *chs7Δ*, sin embargo, resultados de diferentes laboratorios sugerían que en ausencia de su chaperona Chs3 se agregaba en este compartimento bloqueándose así su salida (Kota & Ljungdahl, 2005; Lam et al., 2006). Además, se había demostrado más recientemente que Chs3 oligomerizaba a

través de su extremo N-terminal (Sacristan et al., 2013), ausente en la proteína Δ^{126} Chs3. Por lo tanto, parecía lógico plantearse que la oligomerización de Chs3 fuese la responsable de la agregación de la proteína en ausencia de su chaperona y que esto tuviese que ver con la eficiente salida del RE de la proteína Δ^{126} Chs3. Nuestra hipótesis era, por consiguiente, que la falta de oligomerización de la proteína Δ^{126} Chs3 era la que impedía su agregación en ausencia de Chs7 y, como consecuencia, esta podía salir del RE por *bulk flow*.

Para comprobar dicha hipótesis decidimos llevar a cabo experimentos de agregación con el cross-linker DSP con el objetivo de determinar si la quimera Δ^{126} Chs3 se agregaba en ausencia de Chs7 de la misma forma que lo hacía Chs3. En la **Figura 49A** puede observarse como la adición de DSP no afecta al comportamiento de Chs3 en la cepa WT, pero incrementa significativamente el nivel de agregación de la proteína en el mutante *chs7* Δ (Ag), tal y como ya había sido demostrado (Kota & Ljungdahl, 2005; Lam et al., 2006). Por el contrario, la adición de DSP tiene muy poco efecto sobre la proteína Δ^{126} Chs3 independientemente de la presencia de Chs7, tal y como se deduce de la similitud observada entre las bandas de ambas cepas. Estos resultados nos llevan a inferir que la quimera Δ^{126} Chs3, a diferencia de Chs3, no se agrega en ausencia de Chs7, lo que podría facilitar su salida del RE por un mecanismo de *bulk flow*.

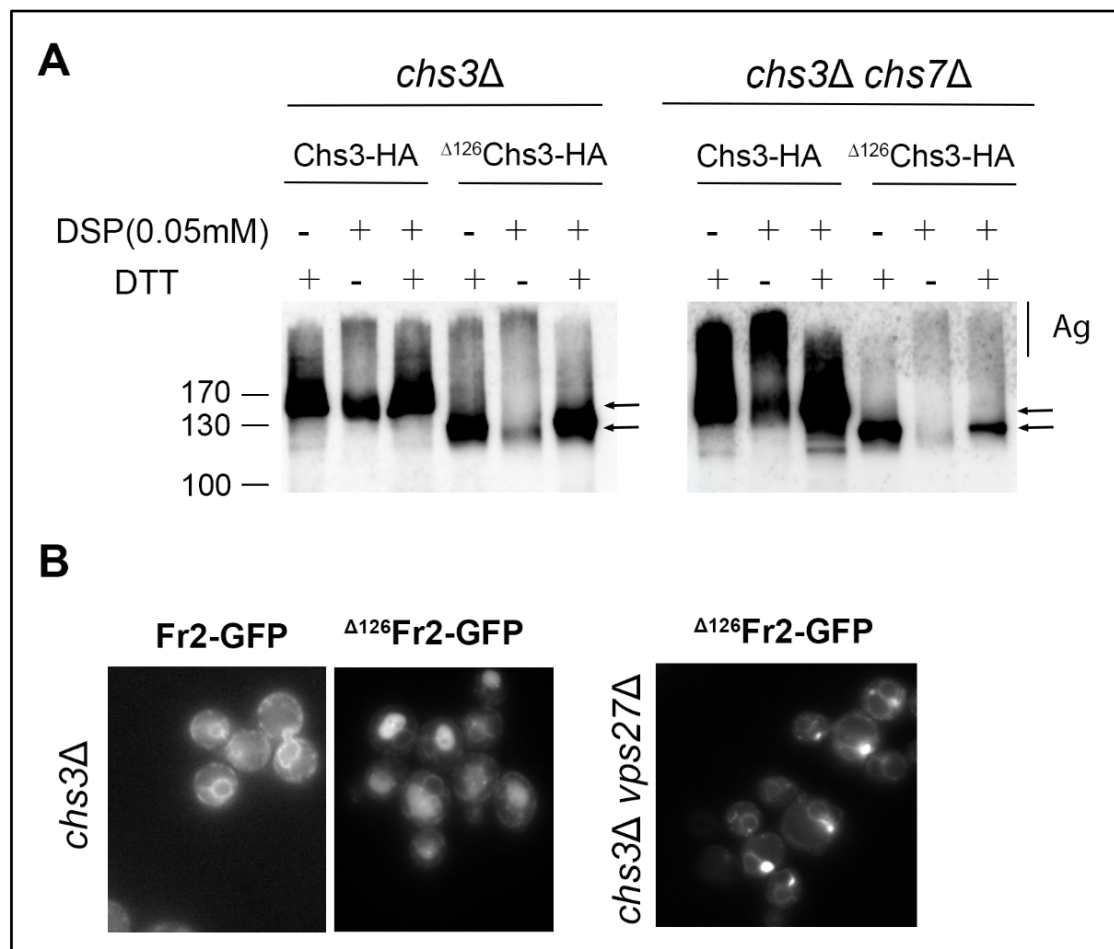


Figura 49. A) Agregación de las proteínas Chs3-HA y Δ^{126} Chs3-HA en presencia de DSP y/o DTT en cepas *CHS7/chs7* Δ (*chs3* Δ). La llave muestra la proteína agregada, mientras que las flechas indicarían las proteínas en su estado monomérico. B) Localización de Fr2-GFP en *chs3* Δ y de Δ^{126} Fr2-GFP en *chs3* Δ y el mutante del ESCRT *chs3* Δ *vps27* Δ .

Para terminar de confirmar nuestra hipótesis analizamos qué pasaba al eliminar los primeros 126 aminoácidos de Chs3 al Fr2, quimera que contiene solo los primeros 490 aminoácidos de Chs3 (Capítulo I) y queda totalmente retenida en el RE, probablemente al ser incapaz de interactuar con Chs7. El análisis microscópico para estudiar la localización de la proteína Δ^{126} Fr2-GFP reveló que esta proteína también era capaz de salir del RE llegando a la vacuola, en lo que parecía una ruta similar a la seguida por la quimera Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7 puesto que requería del ESCRT para su procesamiento definitivo y no parecía implicar el paso de esta proteína por la MP (**Figura 49B**).

Todos los resultados presentados aquí sugieren que es la oligomerización de Chs3 a través de su extremo N-terminal la que media la agregación de la proteína en ausencia de su chaperona, impidiendo de esta manera su salida del RE por un mecanismo de tipo *bulk flow*.

Hemos analizado hasta aquí el tráfico de Chs7 y Δ^{126} Chs3 en paralelo, sin embargo, la diferente naturaleza de estas proteínas, así como su potencial capacidad para interactuar con distintas proteínas, hace necesario que abordemos por separado el estudio de su tráfico en el Golgi y en los compartimentos post-Golgi.

4. ANÁLISIS DEL TRÁFICO EN EL GOLGI Y POST-GOLGI DE Chs7.

A partir de este momento y teniendo en cuenta que Chs7 sale del RE en vesículas COPII y que en ausencia de Chs3 alcanza la vacuola en una vía alternativa dependiente del ESCRT, pero independiente de su paso por la MP, nos propusimos tratar de caracterizar paso por paso dicha vía desde que la chaperona alcanzaba el complejo de Golgi y comparar esta con la ruta que seguía cuando estaba formando un complejo con Chs3, proteína cuyo tráfico había sido ampliamente descrito por diferentes grupos (Valdivia et al., 2002; Copic et al., 2007; Rockenbauch et al., 2012; Huranova et al., 2016).

4.1. En ausencia de Chs3, Chs7 es reciclada al RE por el receptor Erv46 en vesículas COPI.

Se había descrito previamente un sistema de QC en el Golgi que monitorizaba el correcto plegamiento de Chs3 en el RE permitiendo reconocer de forma diferencial versiones defectuosas de la proteína en el Golgi temprano o cis-Golgi (Lam Thesis, 2009; Sacristan et al., 2013) para el reciclaje al RE de estas. Para ver si Chs7 podía estar sometida también a este tipo de control decidimos analizar el tráfico de la chaperona en distintos mutantes afectados en el tráfico retrógrado de proteínas entre el Golgi temprano y el RE, incluyendo en este estudio tanto a mutantes canónicos de la maquinaria COPI como *sec28Δ*, como a mutantes en los receptores Rer1 y Erv46.

En la **Figura 50** se muestra el efecto de estas mutaciones sobre el tráfico de Chs7-SfGFP en ausencia de Chs3. Microscópicamente se puede observar como la intensidad en la tinción vacuolar aumenta significativamente tanto en el mutante *sec28Δ* como en el mutante *erv46Δ*, y en este último caso prácticamente se pierde incluso la señal reticular (**Figura 50A**). Los experimentos de Western Blot mostraban asimismo un incremento significativo en la banda de SfGFP libre en dichos mutantes o, lo que es lo mismo, un aumento en el tráfico de

la proteína a la vacuola (**Figura 50B y C**). Los resultados en el mutante *rer1Δ* no son tan concluyentes por lo que el efecto de Rer1 sobre el tráfico de la proteína sería mínimo en todo caso.

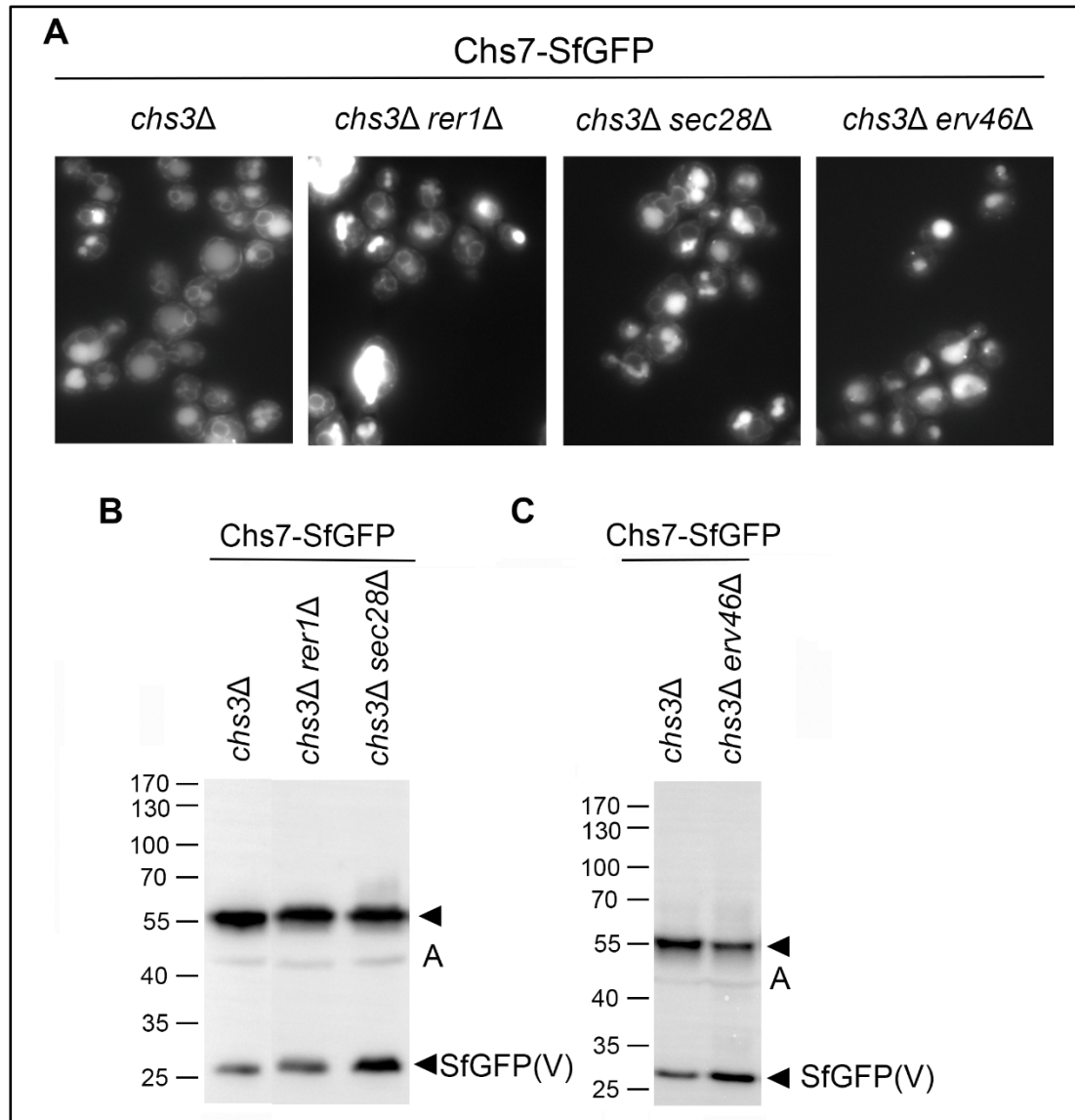


Figura 50. A) Localización de Chs7-SfGFP en las cepas *chs3Δ*, *chs3Δ rer1Δ*, *chs3Δ sec28Δ* y *chs3Δ erv46Δ*. B) Western Blot de Chs7-SfGFP en las cepas *chs3Δ*, *chs3Δ rer1Δ* y *chs3Δ sec28Δ*. C) Western Blot de Chs7-SfGFP en las cepas *chs3Δ* y *chs3Δ erv46Δ*. A= Actina.

En conjunto, estos resultados indican que en ausencia de Chs3, Chs7 es reconocida por el sistema de QC del Golgi temprano para ser reciclada al RE mediante la maquinaria COPI, hecho coherente con los resultados originales que presentaban a Chs7 como una proteína integral del RE (Trilla et al., 1999). Sin embargo, resultados recientes (Dharwada et al., 2018; este trabajo) cuestionan esta condición, al salir Chs7 del RE unida a Chs3, por lo que nos propusimos analizar también el papel de estas mutaciones en el tráfico de Chs7 en condiciones WT, es decir, cuando se forma el correspondiente complejo Chs7-Chs3. El Western Blot presentado en la **Figura 51A** muestra de nuevo como la delección de *SEC28*

incrementa el procesamiento vacuolar de Chs7-SfGFP en ausencia de Chs3, incremento que se veía revertido al expresar a Chs7 conjuntamente con la proteína silvestre Chs3. No hemos sido capaces de observar este mismo fenómeno en el mutante *erv46Δ* ya que en este caso la expresión conjunta con Chs3 no conducía a una disminución en el procesamiento vacuolar de la proteína (**Figura 51B**). Desconocemos las razones de esta discrepancia, pero podemos especular sobre los distintos papeles que ejercen Sec28 y Erv46 en el tráfico retrógrado de proteínas.

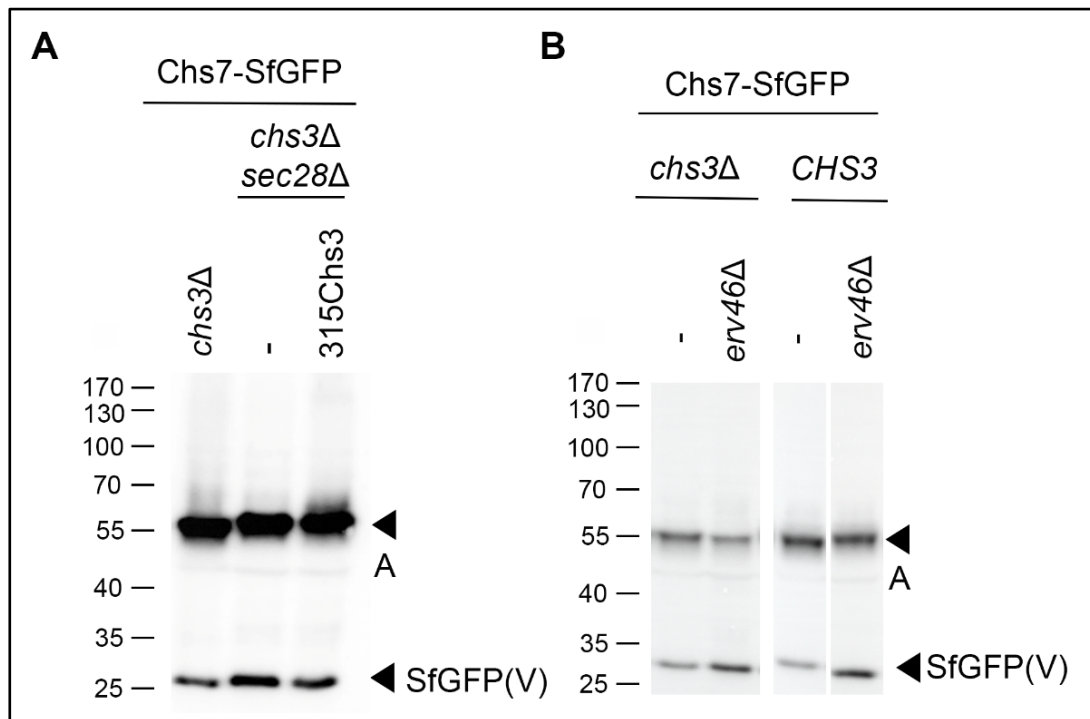


Figura 51. Procesamiento de Chs7-SfGFP en la cepa control *chs3Δ* y en los mutantes *sec28Δ* (A) y *erv46Δ* (B) en función de la presencia/ausencia de Chs3. A= Actina.

Estos resultados sugerían pues la posibilidad de que Chs7 sea reconocida por el sistema de QC del Golgi temprano solamente cuando llega de forma individual a este compartimento, evitándose dicho reconocimiento cuando se forma el complejo Chs3-Chs7. Sin embargo, es importante señalar que estos resultados deben ser puestos en el contexto general del tráfico de Chs3, lo que incluiría los resultados obtenidos con la proteína Δ^{126} Chs3 que se presentarán en partes posteriores de esta memoria.

4.2. La interacción de Chs7 con Chs3 condiciona su clasificación y distribución desde el TGN.

Es bien conocido que la estación principal que regula el tráfico de Chs3 es el compartimento TGN/EE, donde Chs3 interacciona con el exómero y el complejo AP-1, dictándose aquí las reglas básicas de su tráfico post-Golgi, el cual incluiría también la degradación parcial de la proteína en la vacuola. Evidencias recientes (Dharwada et al., 2018;

este trabajo) sugieren que Chs7 acompaña a Chs3 a lo largo de este tráfico, por lo que debe cuestionarse el potencial papel de Chs7 en las etapas tardías del tráfico de Chs3.

Para analizar este posible papel de Chs7 se procedió a determinar la localización intracelular de Chs7-SfGFP en diferentes mutantes en ausencia o presencia de Chs3. Como ya habíamos visto, en la estirpe silvestre Chs7-SfGFP se localiza en la MP, mayoritariamente asociada a la zona del cuello, en una localización muy similar a la descrita para Chs3 (**Figura 52**, fila superior). En el mutante del exómero *chs6Δ*, Chs7-SfGFP (*CHS3*) queda retenida en el TGN en forma de puntos intracelulares discretos. La eliminación del complejo AP-1 (*aps1Δ*) deslocaliza a Chs7 parcialmente del cuello, una deslocalización mucho más aparente al eliminar las GGAs (*gga1/2Δ*). Estas localizaciones serían idénticas a las ya descritas para Chs3 en estos mutantes, por lo que podemos concluir que Chs7 parece viajar mayoritariamente unida a Chs3 a lo largo de todo su tráfico. En ausencia de Chs3 la localización es radicalmente diferente (**Figura 52**, fila inferior). Tal y como hemos mostrado anteriormente, Chs7-SfGFP queda parcialmente retenida en el RE, viajando una parte importante de la proteína a la vacuola, sin que podamos detectar a esta en la MP. La localización en los mutantes del exómero y AP-1 es muy similar a la observada en el control (*chs3Δ*) por lo que estos complejos no parecen intervenir en el tráfico independiente de Chs7. Por el contrario, la localización en el mutante de las GGAs (*gga1/2Δ*) es bastante diferente reduciéndose significativamente la señal vacuolar de Chs7-SfGFP, indicativo de un tráfico reducido de la proteína a la vacuola. Sin embargo, y en contra de lo esperado, la proteína no se llega a visualizar en la MP, lo que confirmaría indirectamente la incapacidad de Chs7 de alcanzar la MP de forma independiente de Chs3.

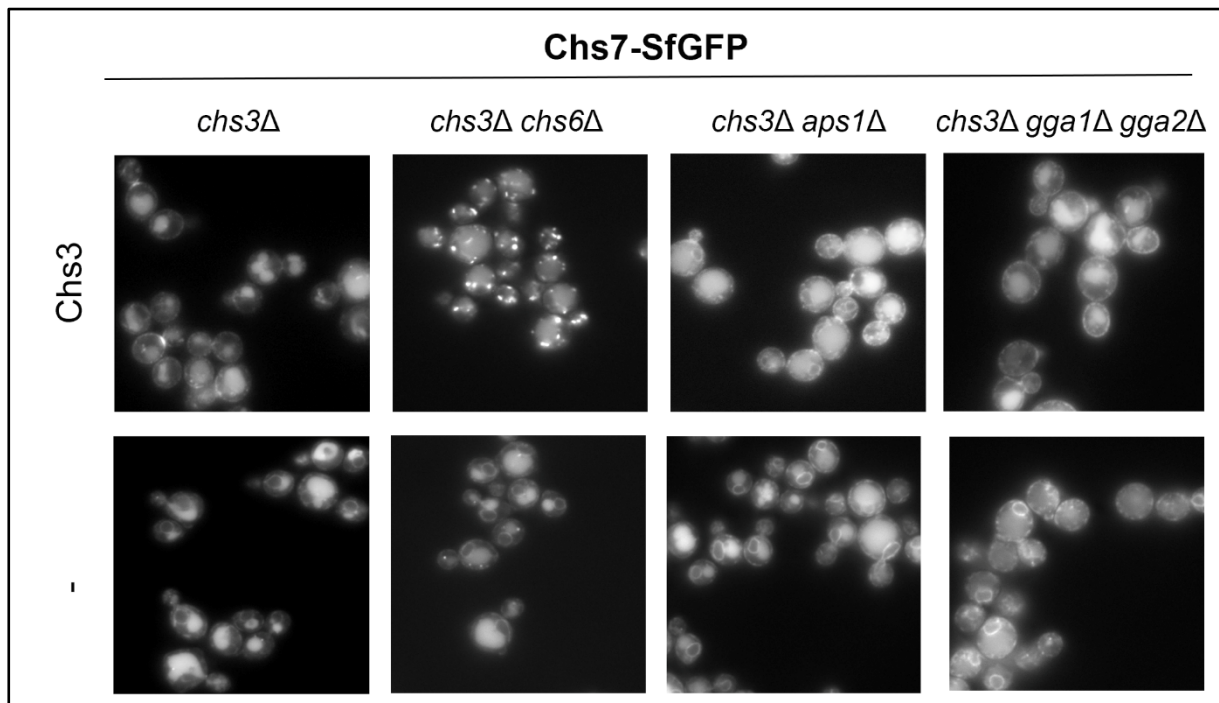


Figura 52. Localización de Chs7-SfGFP en las cepas indicadas a las que se ha introducido un plásmido centromérico con una copia de *CHS3* o vacío (-).

Estos resultados para Chs7-SfGFP se verificaron posteriormente por Western Blot, demostrándose una significativa reducción de la degradación vacuolar de la proteína en el mutante de las GGAs en ausencia de Chs3 (**Figura 53A**, *chs3Δ*), lo que concordaría con un menor tráfico de esta hacia la vacuola tal y como así mostraba la evidencia microscópica. Es interesante resaltar en este punto que la ausencia de las GGAs no afectó a la degradación de Chs7-SfGFP en condiciones silvestres (**Figura 53A**, *CHS3*). Los resultados obtenidos en los mutantes *chs6Δ* y *aps1Δ* confirman la evidencia microscópica de la falta de efecto de estas mutaciones en el tráfico independiente de Chs7 (**Figura 53B y C**).

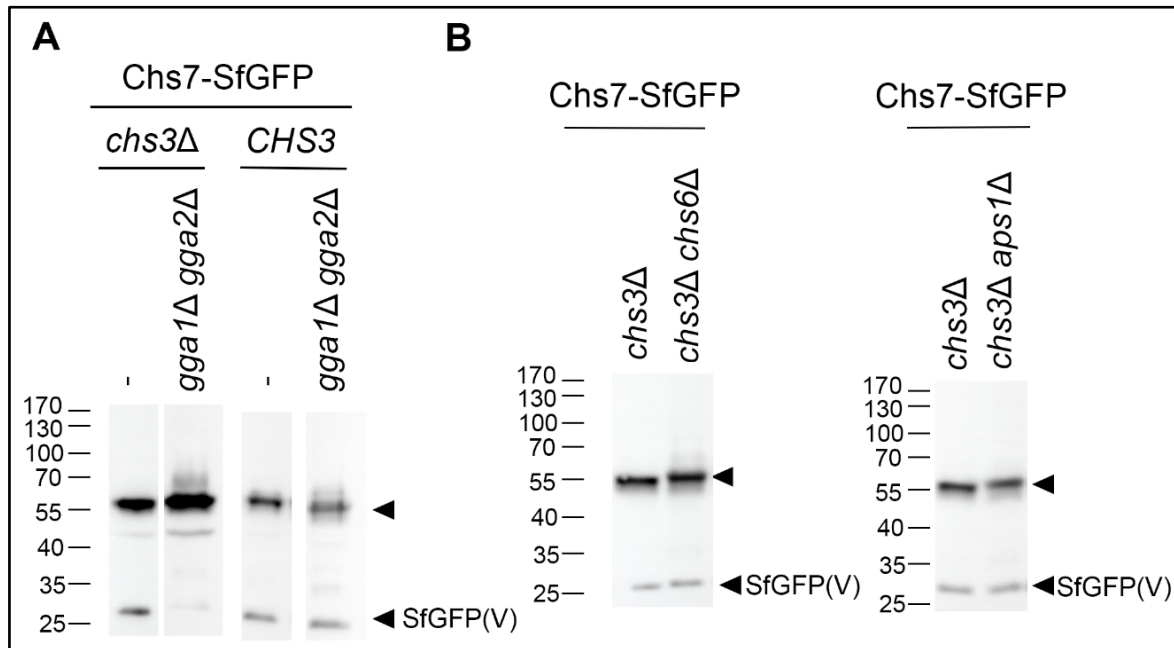


Figura 53. A) Cantidad de proteína/ procesamiento de Chs7-SfGFP en cepas *chs3Δ/CHS3* en función de la presencia de Gga1/2. B) Cantidad de proteína/ procesamiento de Chs7-SfGFP en cepas *chs3Δ*, *chs3Δ chs6Δ* y *chs3Δ aps1Δ*.

Como dato adicional se verificó la interacción directa entre Chs7 y el exómero utilizando para ello la técnica de complementación bimolecular de fluorescencia, marcando por un lado a Chs5 con el fragmento N-terminal de la VENUS y por otro a Chs7 con el fragmento C-terminal de esta misma proteína fluorescente. Los resultados de estos experimentos BiFC se presentan en la **Figura 54** e indican claramente que Chs7 es capaz de interactuar con el exómero en presencia de Chs3, localizándose esta interacción en el cuello y a lo largo de la MP, destino final de la proteína en el complejo. Sin embargo, esta interacción se pierde completamente en ausencia de Chs3. De estos resultados se deduce que la formación del complejo Chs3-Chs7 es la que permite que Chs7 interactúe con el exómero.

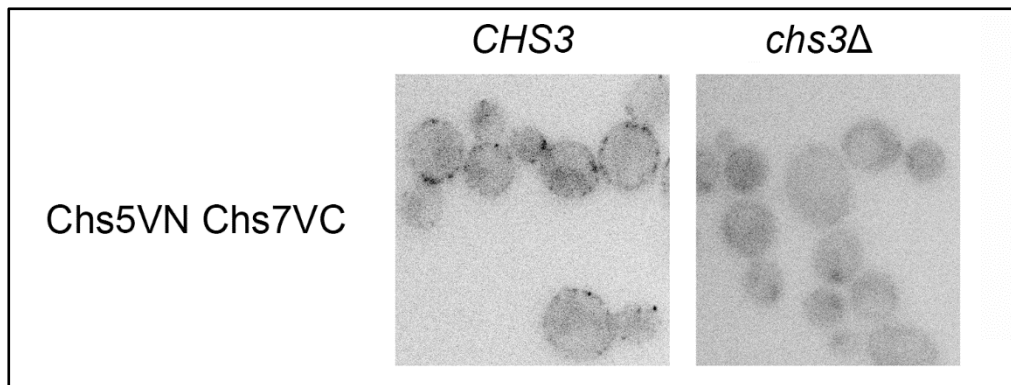


Figura 54. BiFC para Chs5 y Chs7 en una cepa WT (*CHS3*) y un mutante *chs3Δ*.

Del conjunto de todos estos resultados y de algunos presentados en apartados previos se infiere, en primer lugar, que las GGAs participan en la ruta de tráfico independiente a la vacuola de Chs7 mediando su salida en vesículas recubiertas de clatrina desde el TGN/EE, las cuales posteriormente se fusionarían con el PVC para que por último el ESCRT medie la internalización y degradación definitiva de la proteína en la vacuola. En segundo lugar, los resultados presentados aquí sugieren que Chs7 en presencia de Chs3 parece viajar unida a la quitín sintasa a lo largo de toda su ruta de tráfico. En el TGN/EE, Chs3 facilitaría su interacción con el exómero para la salida polarizada del complejo Chs3-Chs7 hasta la MP desde donde Chs7 seguiría la ruta endocítica hasta la vacuola en un camino similar al seguido por Chs3, en base a los resultados previamente obtenidos en el mutante del ESCRT. Sin embargo, carecemos hasta el momento de datos experimentales directos que confirmen que Chs7 viaja unida a Chs3 en este tránsito desde la MP.

4.3. La llegada de Chs7 a la vacuola en ausencia de Chs3 se ve afectada en un mutante de la desubiquitinasa Ubp3.

Los datos obtenidos en la búsqueda masiva sugerían que en el mutante *ubp3Δ* se producía una estabilización de la proteína Chs7^{Δ22}, versión de Chs7 defectuosa en su interacción con Chs3. Esto nos llevó a analizar el papel de Ubp3 en la vía que seguía Chs7 a la vacuola en ausencia de Chs3. En experimentos de microscopía y Western Blots detectamos una fuerte supresión en la llegada a la vacuola de Chs7-SfGFP y en su procesamiento en este compartimento en el mutante *chs3Δ ubp3Δ* (**Figura 55**), lo que sugiere que Ubp3 participa de alguna manera en dicha vía alternativa a la vacuola mediada por las GGAs que seguía Chs7 en ausencia de Chs3. Ubp3 es una desubiquitinasa implicada en numerosas etapas del tráfico, por lo que la interpretación de este resultado resulta compleja. Sin embargo, podemos especular con la posibilidad de que Ubp3 este desubiquitinando algún factor implicado en la salida de Chs7 del TGN/EE en dicha vía, afectando de esta manera al tráfico de la proteína. Este resultado expande el rango de funciones atribuidas a Ubp3, lo que debería ser explorado en un futuro.

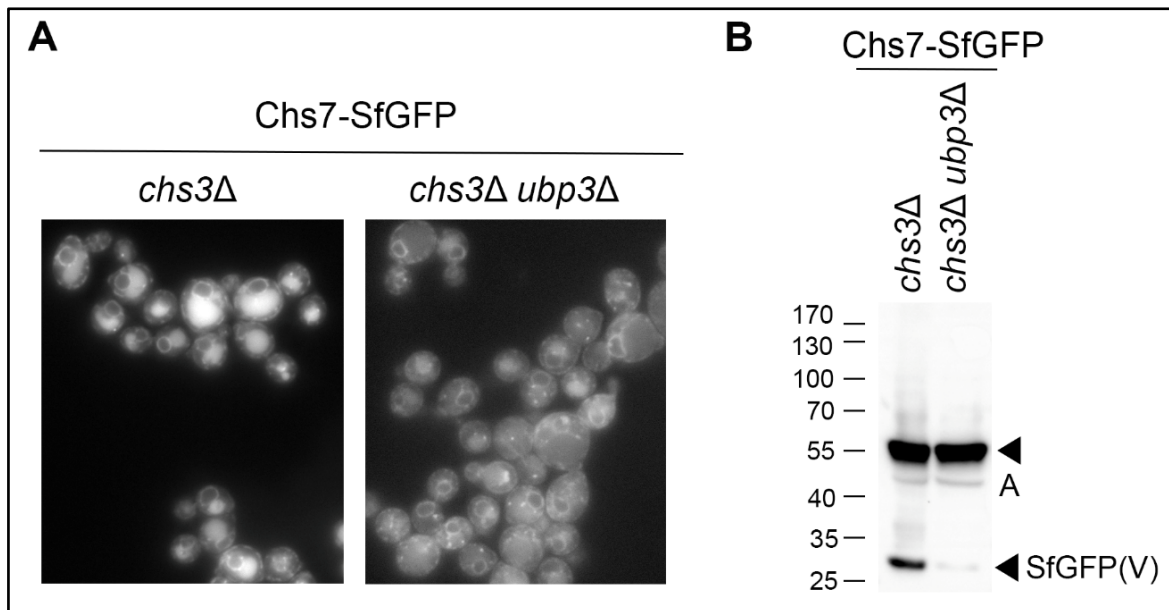


Figura 55. Localización (A) y cantidad de proteína/procesamiento (B) de Chs7-SfGFP en cepas *chs3Δ* y *chs3Δ ubp3Δ*. Se usó actina (A) como control de carga. Nótese la reducción en la tinción vacuolar de Chs7-SfGFP en ausencia de Ubp3, unida a la clara disminución en la banda de SfGFP libre.

5. UN MODELO PARA EL TRÁFICO DE Chs7.

5.1. Tráfico de Chs7 en presencia de Chs3.

De acuerdo con los datos presentados en esta memoria y en otros trabajos (Dharwada et al., 2018), Chs7 recapitula el tráfico de Chs3, por lo que nuestro modelo para el tráfico de Chs7 en presencia de Chs3 se basa en todas las evidencias recogidas a lo largo de los años para el tráfico de Chs3 y se detalla en la **Figura 56**.

En este modelo Chs7 sale del RE en vesículas COPII formando el complejo Chs7-Chs3, siendo esta salida dependiente de su interacción con el receptor Erv14, interacción que de acuerdo con nuestros datos podría estarse dando a través de Chs7. En condiciones normales Chs7 se encuentra en cantidades limitantes (Trilla et al., 1999) por lo que es muy posible que toda la proteína se encuentre en el complejo y avance en el Golgi, no estando sujeta a tráfico retrógrado alguno en vesículas COPI. Una vez que el complejo alcanza el TGN/EE, Chs7 interacciona con el exómero gracias a su asociación con Chs3 siendo ambas proteínas dirigidas a la MP de forma polarizada. La retención ejercida en el TGN/EE por los adaptadores AP-1 y GGAs descrita para Chs3 parecía darse también de la misma manera para Chs7 en el complejo. Por último, nuestros experimentos en el mutante del ESCRT *vsp27Δ* demostraron que Chs7 en el complejo Chs3-Chs7, al igual que Chs3, accedía a la ruta del MVB y de acuerdo con nuestros datos todo apunta a que el reconocimiento por el ESCRT de Chs7 se ve favorecido por la ubiquitinación del complejo Chs7-Chs3 en la MP (Arcones et al., 2016).

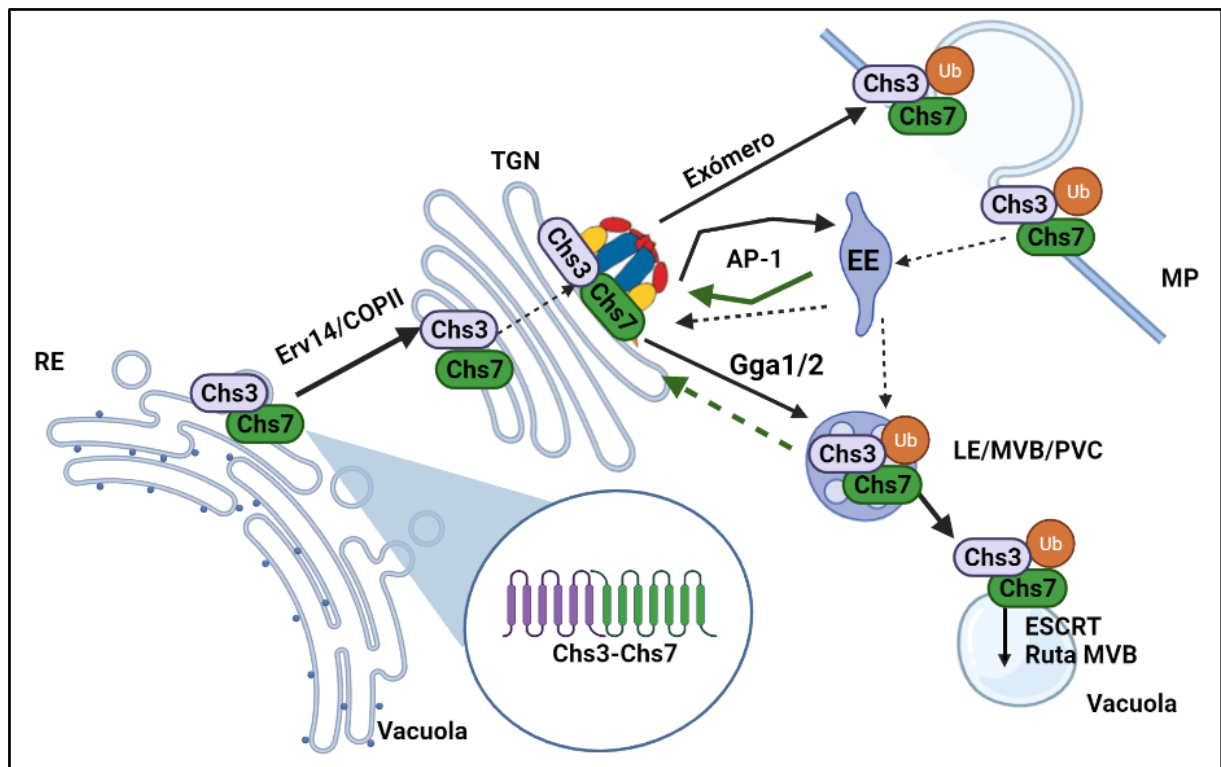


Figura 56. Modelo de tráfico de Chs7 en el complejo Chs7-Chs3. Se indican con flechas discontinuas las partes de este tráfico no verificadas experimentalmente. Las flechas negras se refieren al tráfico anterógrado, mientras que las verdes se refieren al tráfico retrógrado. Por razones didácticas se presenta al EE como un compartimento separado del TGN.

5.2. Tráfico de Chs7 en ausencia de Chs3.

Tomando en consideración todos los resultados presentados proponemos el modelo que se muestra en la **Figura 57** para el tráfico independiente de Chs7. De acuerdo con este modelo una pequeña parte de Chs7 es reconocida por ERAD-L para su degradación proteasomal, mientras que el resto (mayoría) sale del RE en vesículas COPII y de forma dependiente del receptor Erv14. Una vez en el compartimento cis-Golgi, parte de la proteína es reconocida por el receptor Erv46 (el papel de Rer1 se intuye, pero no está claro) siendo reciclada en vesículas COPI al RE. Este mecanismo de reciclado actuaría como un QC adicional que facilitaría el reensamblaje de las subunidades de Chs7 que no han sido capaces de formar complejo con Chs3. Esta visión concuerda con la función de Chs7 como chaperona, que haría de ella una proteína residente del RE. Es muy posible que este tipo de comportamiento se dé también con otras proteínas residentes del RE (Ver Discusión General). Si bien parece que la capacidad de este sistema de reciclado es limitada, por lo que ante una gran cantidad de Chs7 libre en el cis-Golgi, ésta acabaría progresando hasta compartimentos posteriores del Golgi. Una vez alcanzado el TGN/EE, Chs7 sería reconocida por los adaptadores GGAs y dirigida, por lo tanto, en vesículas recubiertas de clatrina a la vacuola donde se internalizaría siguiendo la ruta del cuerpo multivesicular para completar su degradación en este compartimento. Es interesante apuntar aquí que visualizamos esta vía de transporte alternativo de Chs7 a la vacuola justo cuando esta pierde su interacción con Chs3 y, por lo tanto, con el exómero de acuerdo con nuestros experimentos de BiFC.

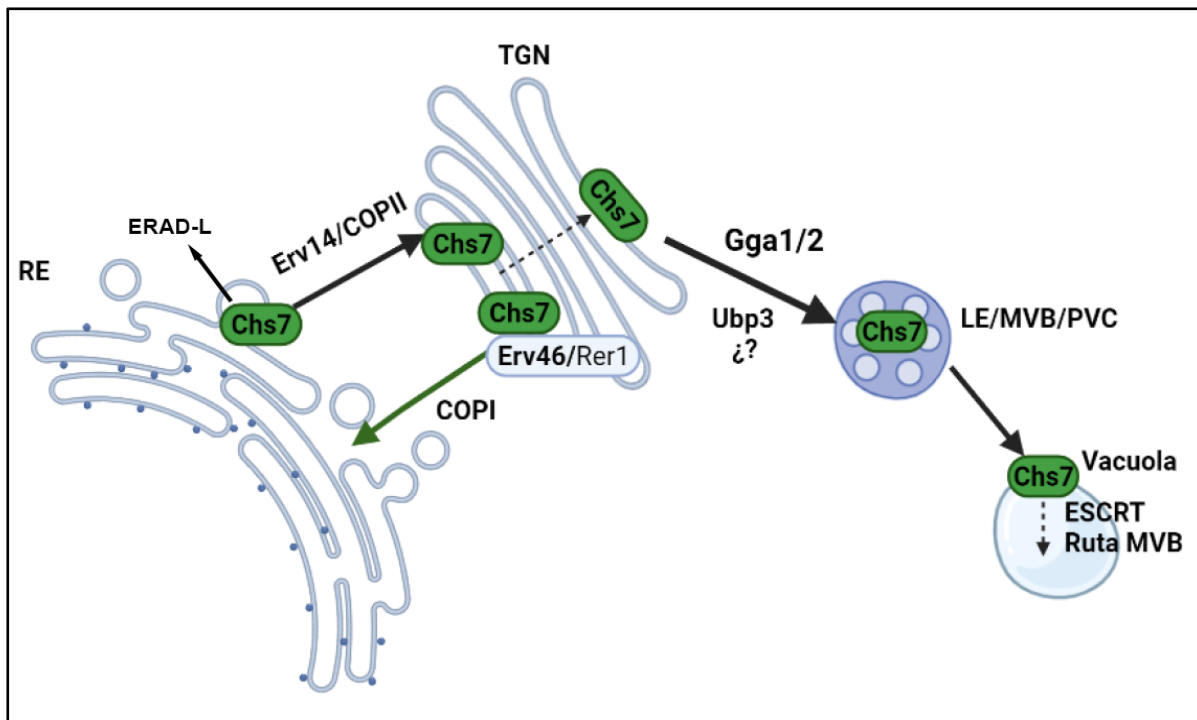


Figura 57. Modelo para el tráfico de Chs7 en ausencia de Chs3. Las flechas negras se refieren al tráfico anterógrado, mientras que las verdes se refieren al tráfico retrógrado.

No podemos determinar con exactitud el papel de Ubp3 en esta ruta, en parte por el hecho de que desconocemos si Chs7 se encuentra o no ubiquitinada. El número de lisinas en la secuencia de Chs7 es bajo, y los programas de predicción no identifican a ninguna de estas como potencialmente ubiquitinables. Además, hasta el momento no se ha encontrado ningún residuo de ubiquitina en Chs7 en ninguno de los estudios a gran escala publicados. Todas estas evidencias indirectas sugieren que Chs7 probablemente no está ubiquitinada, de manera que si la ubiquitinación jugara algún papel en su tráfico debería hacerlo a través de Chs3, que se ha demostrado que se ubiquitina en la MP (Arcones et al., 2016). Esta falta de ubiquitinación podría explicar un limitado reconocimiento de la proteína por el complejo ESCRT en su tráfico independiente (*chs3Δ*), lo que se asociaría con su menor degradación vacuolar y con su masiva acumulación en el endosoma E en el mutante *vsp27Δ* (**Figuras 44 y 45**).

Creemos que esta vía directa a la vacuola desde el TGN/EE se abre para evacuar el exceso de Chs7 no unida a Chs3, lo que estaría de acuerdo con el hecho de que Chs7 es una chaperona específica para Chs3, por lo que al no tener más cargos la proteína no sería necesaria para el adecuado funcionamiento celular, lo que no sucedería en el caso de otras chaperonas o proteínas propias del RE con funciones similares (Ver Discusión General).

Entendemos que esta vía directa a la vacuola no ha sido descrita hasta el momento, puesto que la única ruta de control de calidad caracterizada en el Golgi mediada por GGAs es la ruta mediada por el receptor Vsp10, no seguida por Chs7. En este punto lo más plausible es pensar que existe otro receptor todavía no identificado para Chs7, o bien que se da un reconocimiento directo de Chs7 por las GGAs.

6. ANÁLISIS DEL TRÁFICO EN EL GOLGI Y EN COMPARTIMENTOS POST-GOLGI DE LA QUIMERA Δ^{126} Chs3.

Hasta ahora hemos podido estudiar el tráfico independiente de Chs7, sin embargo, no se ha podido analizar el tráfico independiente de Chs3 al quedar esta proteína totalmente retenida en el RE en ausencia de su chaperona (Trilla et al., 1999). Los resultados presentados previamente en esta memoria nos indican que la quimera Δ^{126} Chs3 es capaz de salir eficientemente de RE, incluso en ausencia de Chs7, constituyendo así una valiosa herramienta para el análisis del tráfico independiente de Chs3. Por lo tanto, nos centramos ahora en analizar el tráfico de esta proteína tanto en presencia como en ausencia de la chaperona Chs7.

6.1. La quimera Δ^{126} Chs3 es reconocida en el cis-Golgi desde donde es reciclada al RE en vesículas COPI.

El reciclado de la quimera Δ^{126} Chs3 por el receptor Rer1 desde el cis-Golgi al RE ya se había descrito en presencia de Chs7, ligándose este al defecto en oligomerización de esta proteína y a la exposición en estas condiciones de un dominio dilisina en su extremo C-terminal (Sacristan et al., 2013). Para confirmar el potencial papel de la unión a Chs7 en este tráfico, llevamos a cabo experimentos de microscopía y Western Blot con la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en presencia o ausencia de la chaperona.

En primer lugar, revisamos el efecto del receptor Rer1. En la **Figura 58A** se muestra uno de los Western Blots realizados para analizar este efecto tanto en ausencia como en presencia de Chs7. Puede observarse como la ausencia de Rer1 incrementa el procesamiento vacuolar de Δ^{126} Chs3-GFP en ausencia de Chs7, pero no en condiciones WT donde su efecto es despreciable. Cuantificando las ratios entre la cantidad de proteína procesada en la vacuola y la cantidad de proteína sin degradar en varios experimentos pudimos confirmar estadísticamente estos resultados (**Figura 58B**). El hecho de que solo viésemos un efecto de Rer1 en ausencia de Chs7 sugería que este receptor podría estar reconociendo a la quimera como consecuencia del fallo en el ensamblaje del complejo Chs7- Δ^{126} Chs3, lo que estaría de acuerdo con el papel descrito para este receptor en el reciclaje de subunidades de complejos desensamblados (Sato et al., 2004; revisado en Annaert & Kaether, 2020). Aunque este resultado contrasta con el demostrado efecto de Rer1 sobre esta proteína en condiciones WT (Sacristan et al., 2013), las aproximaciones experimentales seguidas aquí son diferentes, lo que podría explicar las diferencias.

Los resultados para el mutante *erv46* Δ se presentan en la **Figura 58C**. En este caso se observa como en dicho mutante se incrementa la banda libre de GFP tanto en presencia como en ausencia de Chs7, lo que indicaría que Erv46 está reconociendo a Δ^{126} Chs3-GFP con independencia de su interacción con Chs7. Por lo tanto, parece que este receptor es capaz de reconocer de forma independiente tanto a Chs7 como a la proteína Δ^{126} Chs3. No hemos observado ningún efecto de la mutación *erv46* Δ en el tráfico de la proteína silvestre Chs3 (resultados no mostrados).

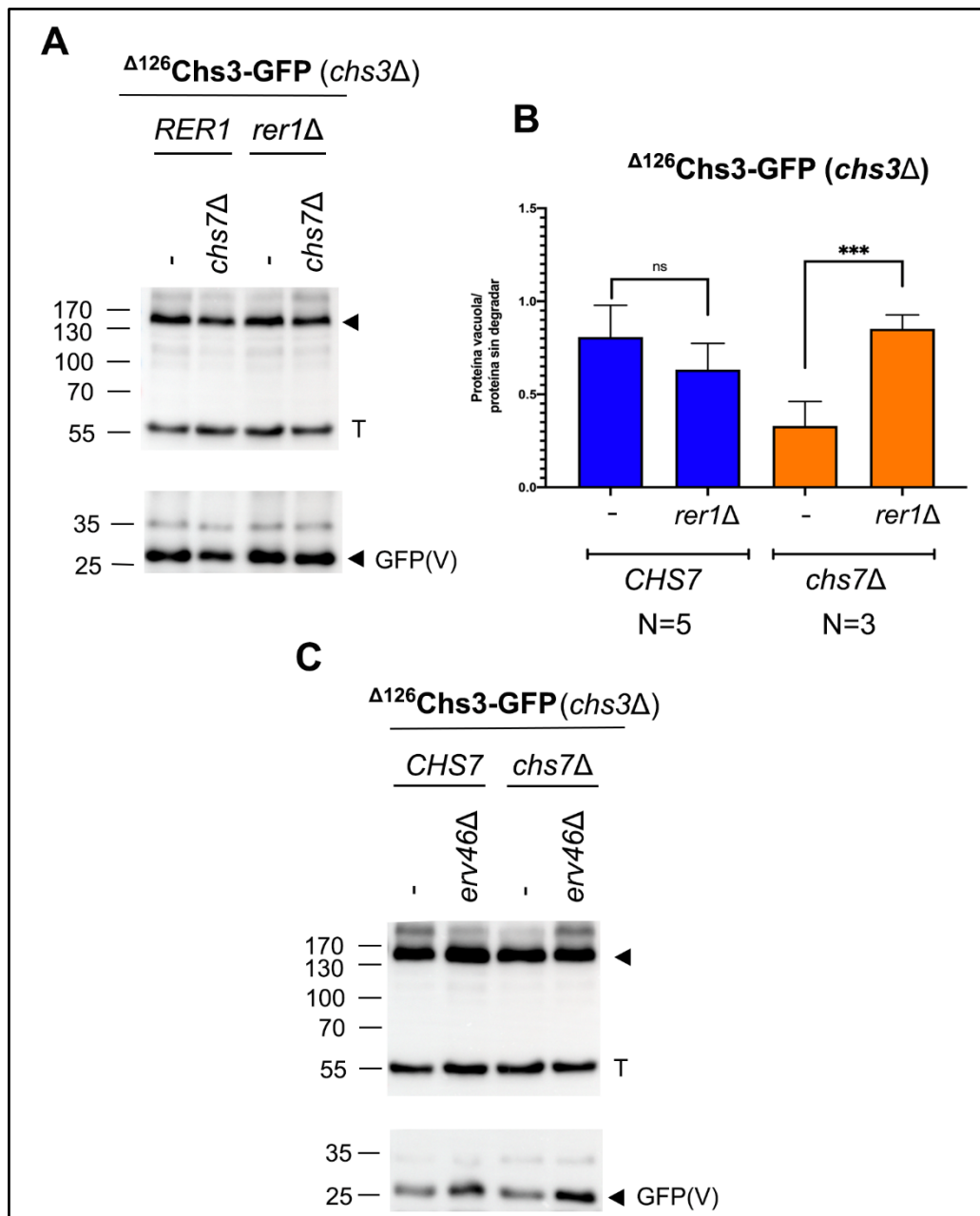


Figura 58. A) Cantidad de proteína/procesamiento de la quimera $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP (chs3}\Delta\text{)}$ en función de la presencia de Chs7 y del receptor del cis-Golgi Rer1. B) Cuantificación de la ratio de proteína $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ en la vacuola/ $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ sin degradar en las cepas de A (Datos de varios experimentos de Western Blot). Para calcular la significación se usó un t-test para datos desapareados. ***= p-valor<0.001. C) Cantidad de proteína/procesamiento de la quimera $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP (chs3}\Delta\text{)}$ en función de la presencia de Chs7 y del receptor Erv46. T=Tubulina.

Como una segunda aproximación estudiamos el efecto del motivo dilisina localizado en el C-terminal de la proteína (**Figura 59**). En condiciones WT (*CHS7*) observamos como la proteína $\Delta^{126}\text{Chs3}^{\text{KK}}\text{-GFP}$ sale más eficientemente del RE (**Figura 59A**, fila superior), aumentando la cantidad de esta en la MP, de forma similar a lo descrito (Sacristan et al., 2013). De acuerdo con este mayor tráfico a la MP, el nivel de GFP libre es significativamente superior para esta proteína (**Figura 59B**, *CHS7*) al alcanzar la vacuola en mayor medida tras su endocitosis. Sin embargo, la localización observada en el mutante *chs7 Δ para la proteína $\Delta^{126}\text{Chs3}^{\text{KK}}\text{-GFP}$ era muy similar a la de $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ y los niveles de GFP libre parecían*

incluso algo inferiores (**Figura 59**), lo que descartaba el papel de este dominio dilisina en el reconocimiento de la proteína Δ^{126} Chs3 por COPI cuando esta se encuentra aislada (*chs7* Δ).

En resumen, podemos concluir que la quimera Δ^{126} Chs3-GFP sufre un proceso de reciclado al RE en vesículas COPI tanto en presencia como en ausencia de la chaperona Chs7. En ausencia de Chs7 ese reciclaje se basa en el reconocimiento por Rer1 de la quimera desensamblada, mientras que en presencia de Chs7 una o varias señales presentes en la chaperona y el motivo dilisina de la quimera Δ^{126} Chs3 parecen garantizar el reciclado del complejo. En ambos casos el receptor Erv46 estaría contribuyendo al reciclado de la quimera.

Más importante, el hecho de que la proteína Δ^{126} Chs3-GFP se recicle con independencia de la presencia de Chs7 sugiere que el defecto en oligomerización descrito para esta proteína (Sacristan et al., 2013) constituye en sí mismo una señal para el reconocimiento por los sistemas de QC del Golgi temprano. Igualmente, que Chs7 se recicle junto a esta quimera, pero no junto a Chs3, nos lleva a pensar que el ensamblado del complejo Chs7- Δ^{126} Chs3 es defectuoso y conduce a la exposición de señales que quedan ocultas en el complejo Chs7-Chs3. Esto último apunta a una menor capacidad de la proteína Δ^{126} Chs3 para interactuar con Chs7 y así formar el complejo CSIII funcional, seguramente ligada al defecto en la oligomerización de la proteína. Esta posibilidad ya había sido completada anteriormente en el laboratorio en experimentos de co-inmunoprecipitación (Sacristán, Muñoz y Roncero; resultados no publicados).

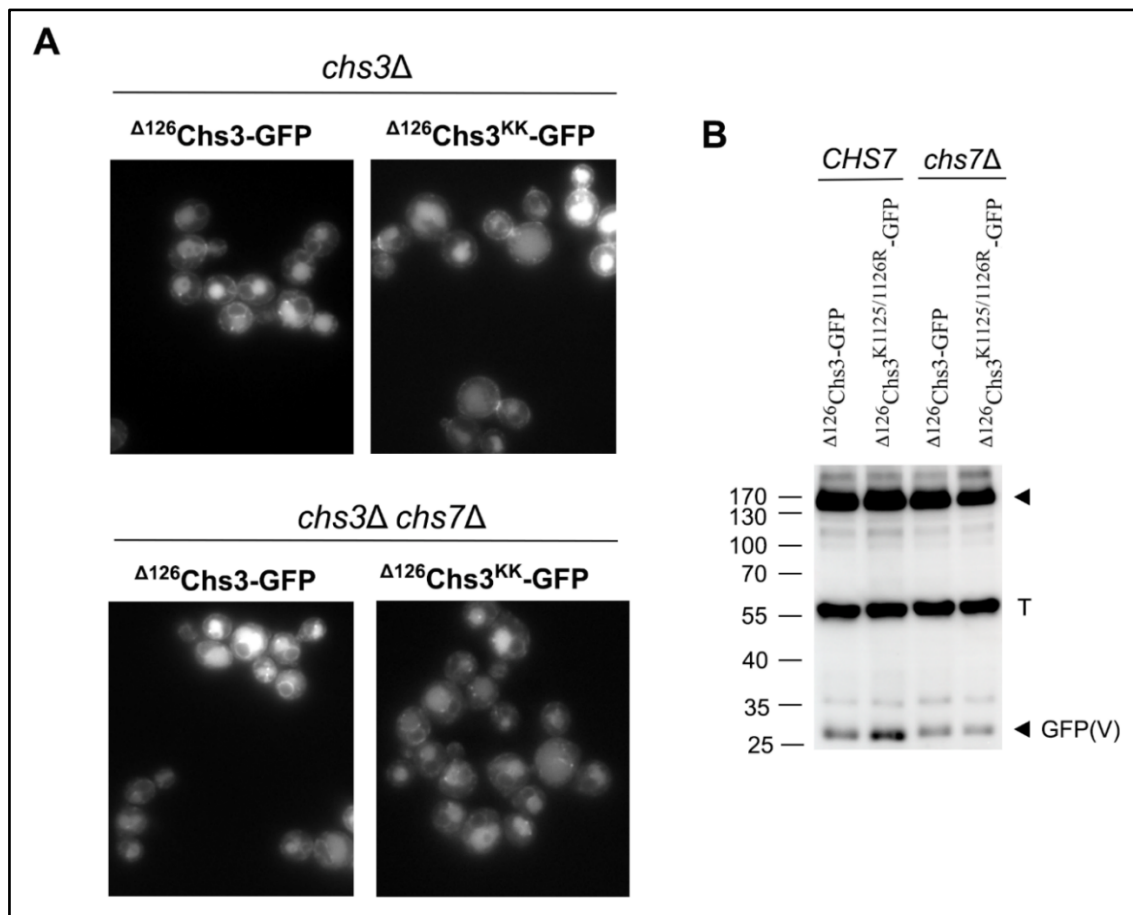


Figura 59. Localización (A) y cantidad de proteína/procesamiento (B) de Δ^{126} Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3^{KK}-GFP en mutantes *chs3* Δ y *chs3* Δ *chs7* Δ .

6.2. Del TGN/EE a la vacuola. Análisis del tráfico independiente de Δ^{126} Chs3.

6.2.1. El tráfico independiente de Δ^{126} Chs3 no depende de las GGAs.

El análisis preliminar de la vía a la vacuola que podía estar siguiendo la quimera Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7 sugería que ésta era dependiente del ESCRT, pero no implicaba el paso de la proteína por la MP ni por otras vías ya descritas de transporte a este compartimento. Puesto que Chs7, cuando no formaba un complejo con Chs3, era dirigida a la vacuola vía GGAs, pensamos que quizás estos adaptadores eran también los responsables de la ruta vacuolar de la quimera Δ^{126} Chs3. Para verificarlo estudiamos el efecto de la ausencia de Gga1/2 en este tráfico, utilizando siempre como control a la proteína silvestre Chs3.

En presencia de Chs7, la ausencia de Gga1/2 alteraba parcialmente el tráfico de Chs3-GFP, distribuyéndose esta proteína de forma relativamente uniforme a lo largo de la MP, algo similar a lo observado en el caso de Δ^{126} Chs3-GFP (**Figura 60A**, panel izquierdo). En ausencia de Chs7, la falta de estos adaptadores no tenía ningún efecto, quedando Chs3-GFP retenida en el RE y la proteína Δ^{126} Chs3-GFP entre el RE y la vacuola (**Figura 60A**, panel derecho), de forma similar a lo observado en el control. Conclusiones similares se deducen de los resultados de los experimentos de Western Blot donde el procesamiento vacuolar de la proteína Δ^{126} Chs3-GFP no se veía afectado ante la ausencia de las GGAs (**Figura 60B**).

Como una segunda aproximación decidimos estudiar la interacción de estos adaptadores con Chs3 y la proteína Δ^{126} Chs3 mediante experimentos de BiFC. Lo esperable era que observásemos una interacción como consecuencia del ya descrito papel de retención de estos adaptadores sobre Chs3 en el TGN/EE (Copic et al., 2007). En el caso de Chs3 (*CHS7*) se observan puntos internos indicativos de una posible interacción de ésta con las GGAs en el TGN/EE; sin embargo, el número y la intensidad de los puntos era muy inferior en el caso de la proteína Δ^{126} Chs3, lo que indicaría una considerable reducción en su interacción con estos adaptadores, la cual además no parecía depender de su asociación con Chs7 (**Figura 60C**). Este resultado podría explicar por qué esta proteína, a diferencia de Chs7, no seguía una vía alternativa a la vacuola mediada por las GGAs cuando se encontraba como una subunidad desensamblada.

El hecho de que dichos adaptadores no participasen en la vía independiente de Δ^{126} Chs3 desde el TGN/EE a la vacuola, pero sí que lo hiciesen en la vía que seguía Chs7 cuando no se encontraba formando el correspondiente complejo con Chs3/ Δ^{126} Chs3, sugería que estas vías alternativas a la vacuola eran distintas en lo que respecta a la salida del TGN/EE de estas proteínas. Estas diferencias también se intuían al examinar el papel de Ubp3 sobre el tráfico independiente de la quimera ya que en este caso no fuimos capaces de ver efecto alguno en el procesamiento vacuolar de la quimera en el mutante *ubp3 Δ* , a pesar de que en la microscopía se observaba un bloqueo en la llegada a la vacuola de la proteína (**Figura A5**, Anexo). La interpretación de este resultado resulta compleja teniendo en cuenta los múltiples papeles de esta desubiquitinasa en el tráfico.

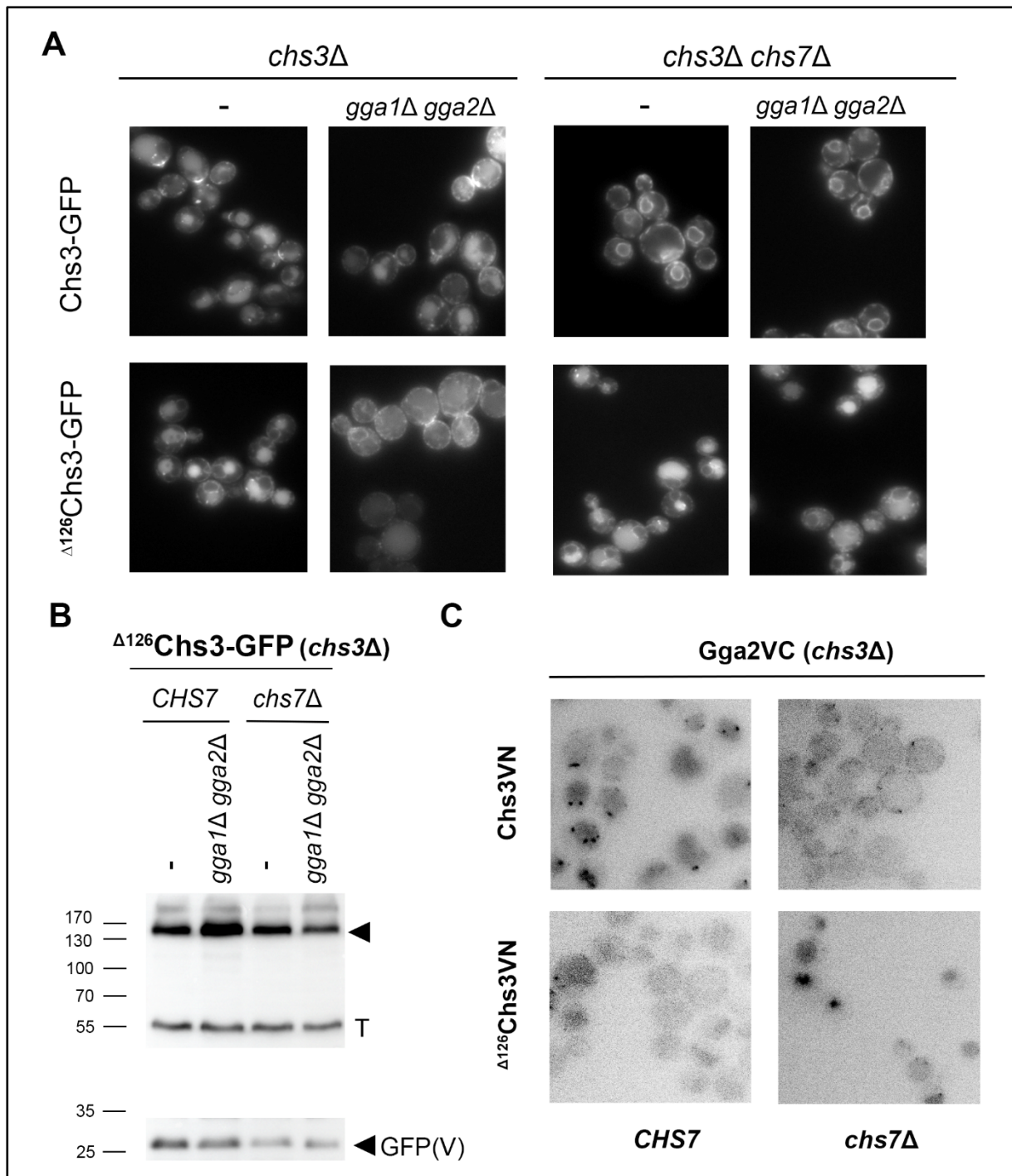


Figura 60. A) Localización de Chs3-GFP y la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en cepas *CHS7/chs7Δ* en función de la presencia/ausencia de las GGAs (*chs3Δ*). B) Cantidad de proteína /procesamiento de la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en cepas de la microscopía usando tubulina (T) como control de carga. C) BiFC entre Gga2VC y Chs3VN/ Δ^{126} Chs3VN en cepas *CHS7/chs7Δ* (*chs3Δ*).

Además de estudiar el papel de las GGAs y de Ubp3 en esta vía alternativa a la vacuola que seguía la quimera en ausencia de Chs7, y habiendo ya descartado que esta ruta fuese una de las descritas en la bibliografía, analizamos el papel de otras proteínas como Tul1, E3 implicada en el control de calidad en el Golgi, pero ninguno de nuestros resultados apuntaba a implicación alguna de esta E3 en el direccionamiento a la vacuola de la quimera (**Figura A4**, Anexo). Solo en los mutantes del ESCRT (**Figura 45B**), de la SNARE de fusión Vam3 y de la

proteasa vacuolar Pep4 la banda de GFP libre resultado del procesamiento de la proteína se reducía de forma significativa o se eliminaba en su totalidad (**Figura A4**, Anexo). Considerando que tanto el ESCRT como Vam3 y Pep4 participan en los pasos tardíos del procesamiento en la vacuola, hasta el momento no hemos podido todavía determinar los componentes de esta vía que estarían participando en el reconocimiento temprano de la quimera en el TGN/EE.

6.2.2. La quimera Δ^{126} Chs3 alcanza la vacuola en ausencia de Chs7 en una vía dependiente del ESCRT, pero que parece independiente de su ubiquitinación.

El análisis realizado hasta el momento identificaba al complejo ESCRT como parte esencial del tráfico independiente de Δ^{126} Chs3 a la vacuola desde el TGN/EE. Teniendo en cuenta que este complejo reconoce mayoritariamente proteínas ubiquitinadas, decidimos estudiar como afectaba la ubiquitinación al tráfico de la quimera en dicha vía usando para ello un mutante de la quimera en todos los sitios susceptibles de ubiquitinación establecidos para Chs3 de acuerdo con los programas de predicción (Arcones et al., 2016). Así construimos el mutante al que denominamos Δ^{126} Chs3^{12K}-GFP (Ver Materiales y Métodos), en el que se habían sustituido 12 lisinas potencialmente ubiquitinables por arginina. No podemos descartar que alguna lisina adicional sea ubiquitinada, pero se ha demostrado que un mutante de la proteína completa Chs3 carente de estos sitios de ubiquitinación presenta niveles extremadamente bajos de ubiquitinación (Arcones et al., 2016).

En la **Figura 61A** se muestra como la proteína Δ^{126} Chs3^{12K}-GFP presenta una localización similar a la de Δ^{126} Chs3-GFP en condiciones WT (*CHS7*), aunque su nivel de degradación en la vacuola se encuentre significativamente reducido (**Figura 61B**). La reducción en el procesamiento vacuolar de la proteína mutante Δ^{126} Chs3^{12K}-GFP podría explicarse por la combinación de una endocitosis reducida desde la MP y la falta de ubiquitinación promovida por el módulo Art4/Rsp5 en la MP, necesaria para su reconocimiento por el ESCRT (Arcones et al., 2016). Por el contrario, en ausencia de Chs7, las proteínas Δ^{126} Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3^{12K}-GFP tienen un comportamiento idéntico en lo que se refiere a su localización y procesamiento en la vacuola (**Figura 61**), indicativo de un posible tráfico independiente de ubiquitinación cuando estas proteínas no forman el correspondiente complejo con la chaperona.

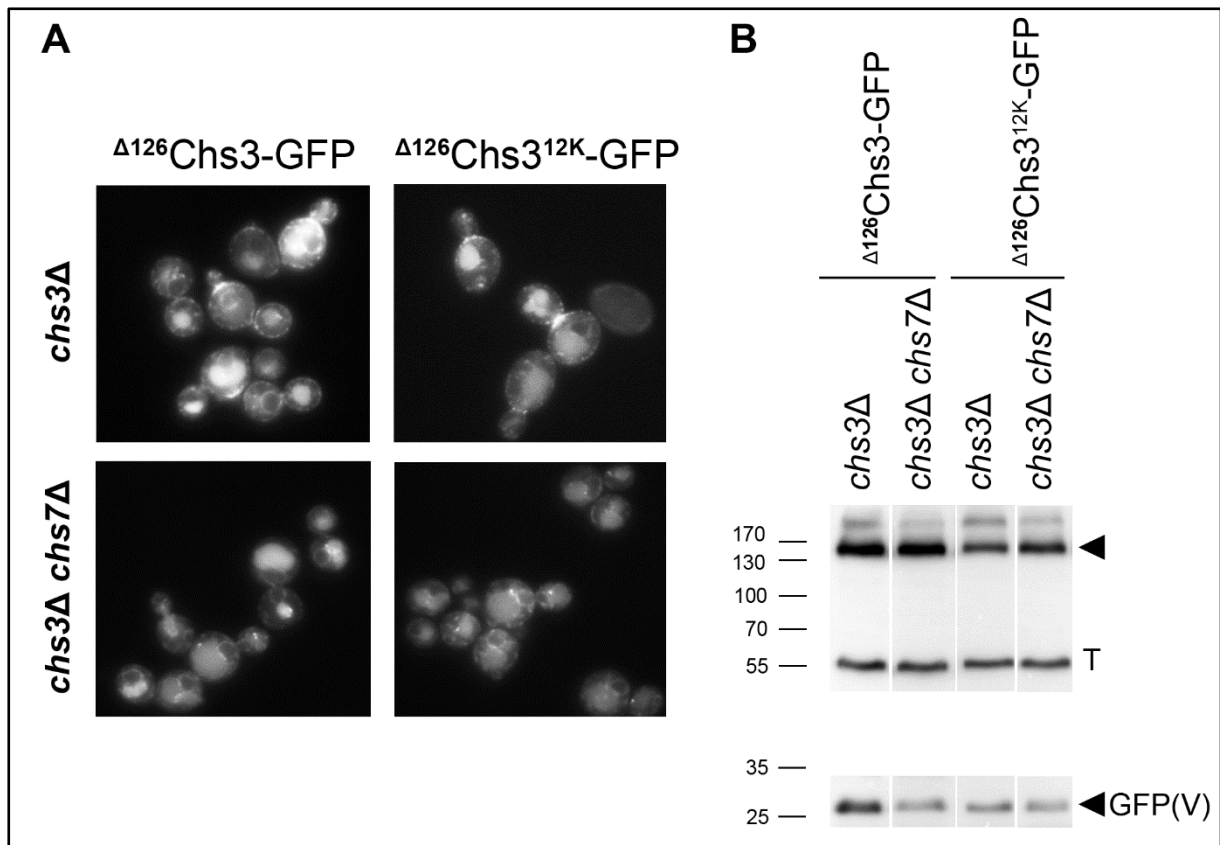


Figura 61. Localización (A) y cantidad de proteína/procesamiento (B) de las quimeras $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ y $\Delta^{126}\text{Chs3}^{12\text{K}}\text{-GFP}$ en cepas *CHS7/chs7Δ* (*chs3Δ*).

Debemos por tanto concluir que la formación del complejo $\text{Chs7-}\Delta^{126}\text{Chs3}$ conlleva sistemáticamente un mayor procesamiento vacuolar de la quimera, ligado seguramente a su paso por la MP donde la proteína sería capaz de ser ubiquitinada en alguno de los sitios mutados, ausentes en la versión $\Delta^{126}\text{Chs3}^{12\text{K}}$. En ausencia de Chs7 la proteína $\Delta^{126}\text{Chs3-GFP}$ accedería a una vía alternativa de transporte a la vacuola que, parecía independiente de ubiquitinación, de forma similar a lo descrito previamente en esta memoria para el tráfico independiente de Chs7. En este punto, y para descartar definitivamente el papel de la ubiquitinación en este tráfico, quedaría por analizar el efecto de las arrestinas, adaptadores que reconocen a sus cargos en múltiples compartimentos celulares facilitando su ubiquitinación por distintas ubiquitin ligasas. Si se confirma el estado desubiquitinado de estas proteínas en este tráfico, deberían dedicarse esfuerzos adicionales para la caracterización de estas vías ya que el proceso de reconocimiento por el ESCRT de proteínas no ubiquitinadas permanece prácticamente inexplorado.

7. Chs7 ES NECESARIA PARA LA LLEGADA DE Chs3 A LA MP. LA QUIMERA Δ^{126} Chs3 COMO MODELO.

De acuerdo con los resultados presentados, la quimera Δ^{126} Chs3 era capaz de alcanzar el TGN/EE de forma independiente de Chs7, por lo que esta se presentaba como un excelente modelo para estudiar el papel de Chs7 en el tráfico post-Golgi de Chs3, cosa que no podíamos hacer con la proteína silvestre que quedaba fuertemente retenida en el RE en ausencia de Chs7 (Trilla et al., 1999).

En el único modelo previamente descrito para el complejo Chs3-Chs7 (Dharwada et al., 2018), el tráfico post-Golgi de Chs3 se presentaba como independiente de Chs7; sin embargo, el hecho de que la quimera Δ^{126} Chs3 no fuese capaz de alcanzar la MP en ausencia de Chs7 sugería que la chaperona podía ser necesaria para la salida a ese compartimento de la proteína. Nos planteamos, por lo tanto, si Chs7 también era necesaria en el TGN/EE para la salida de Chs3 a la MP.

Para estudiar esto lo primero que hicimos fue analizar cómo se estaba produciendo la interacción del exómero con Chs3 en función de la presencia de Chs7, usando la proteína Δ^{126} Chs3 y la BiFC como herramienta molecular. En estos experimentos observamos como en condiciones WT (*CHS7*), las proteínas Chs3 y Δ^{126} Chs3 interaccionan de forma efectiva con el exómero, localizándose la fluorescencia en puntos discretos mayoritariamente distribuidos a lo largo de la MP (**Figura 62A**). En ausencia de Chs7 esa localización polarizada en la MP se perdía completamente, apareciendo un reducido número de puntos intracelulares, que podrían corresponderse con el TGN/EE o el RE en el caso de la quimera y seguramente con el RE en el caso de Chs3 debido a la retención total de esta última en este compartimento en ausencia de su chaperona (**Figura 62A**). De este resultado se deduce que Chs7 sería necesaria para la interacción con el exómero de Δ^{126} Chs3 en el TGN/EE y, por lo tanto, para la salida polarizada a la MP del correspondiente complejo Chs7- Δ^{126} Chs3. Esta conclusión debe extrapolarse a Chs3, aunque no pueda verificarse experimentalmente. Debemos tener en cuenta aquí también el resultado ya presentado según el cual la interacción de Chs7 con el exómero es totalmente dependiente de Chs3 (**Figura 54**), lo que nos lleva a la interpretación de que es el complejo Chs3-Chs7 el responsable de una interacción efectiva con el exómero. La relevante implicación de Chs7 en la llegada de Chs3/ Δ^{126} Chs3 a la MP también se vislumbraba en nuestros experimentos de represión de la expresión de Chs7 con el promotor pGAL donde observábamos como a medida que se reducía la expresión de la chaperona, la proteína Δ^{126} Chs3-GFP dejaba de llegar a la MP para seguir esa ruta alternativa a la vacuola característica de la quimera (**Figura A6**, Anexo).

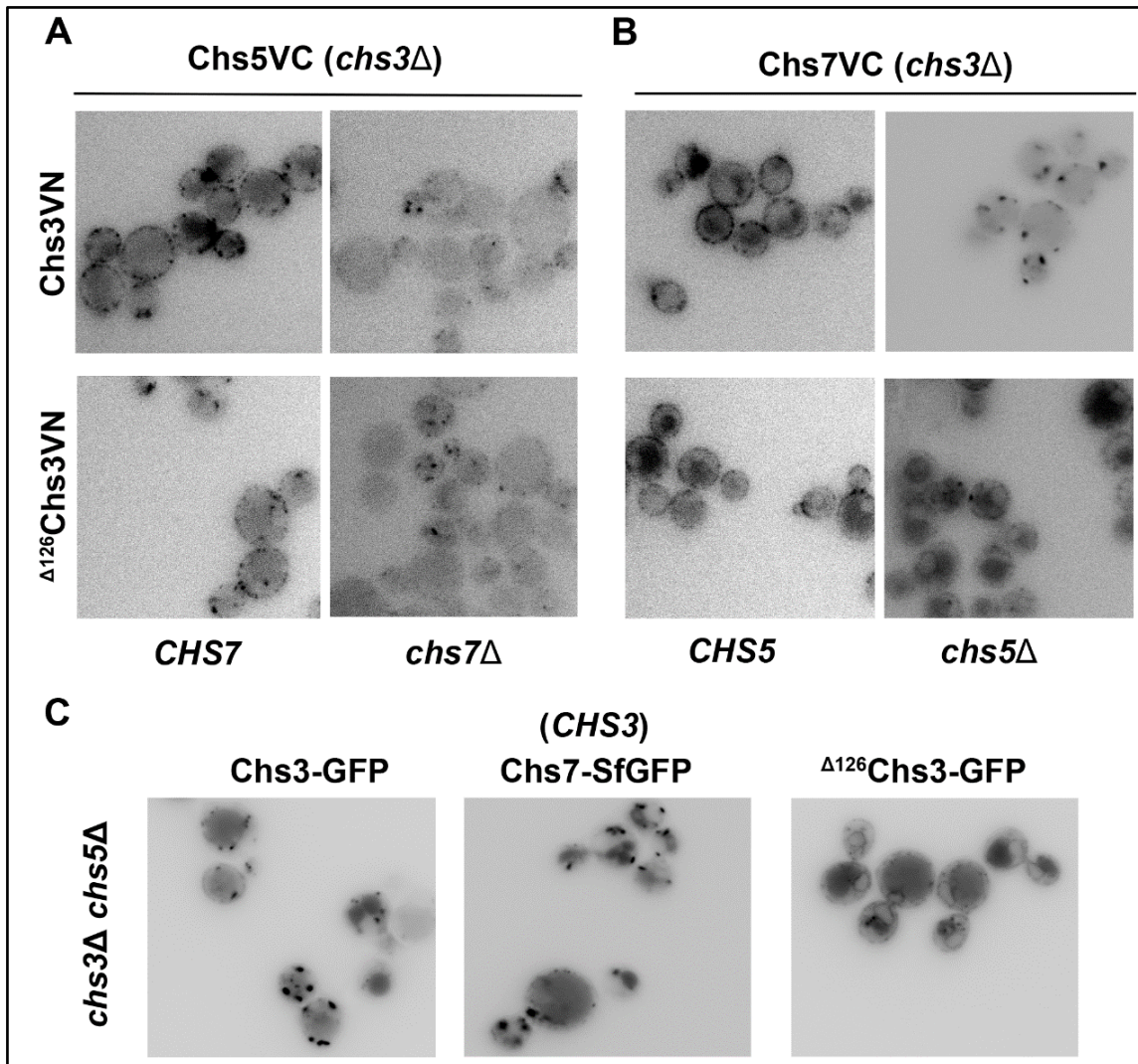


Figura 62. A) BiFC entre Chs5VC y Chs3/ Δ^{126} Chs3VN (pRS315) en cepas *chs3Δ* y *chs3Δ chs7Δ*. B) BiFC entre Chs7VC y Chs3/ Δ^{126} Chs3VN (pRS315) en cepas *chs3Δ* y *chs3Δ chs5Δ*. C) Localización de Chs3-GFP, Chs7-SfGFP (en presencia de Chs3) y de la quimera Δ^{126} Chs3-GFP en un mutante del exómero *chs3Δ chs5Δ*. Las fotos se han invertido para visualizar mejor los puntos.

A mayores exploramos, también por experimentos de BiFC, la interacción entre Chs7 y Chs3 / Δ^{126} Chs3 en función de la presencia del exómero. En presencia del exómero, Chs7 interacciona de forma efectiva tanto con Chs3 como con Δ^{126} Chs3, localizándose la fluorescencia mayoritariamente en el cuello y la MP, aunque una pequeña cantidad del complejo BiFC parece localizarse en la vacuola (**Figura 62B**, *CHS5*). En ausencia del exómero (**Figura 62B**, *chs5Δ*), la interacción Chs7-Chs3 es completamente visualizada en forma de puntos intracelulares correspondientes al TGN/EE, en una localización idéntica a la observada para Chs3-GFP y Chs7-SfGFP (*CHS3*) (**Figura 62C**). En el caso de la interacción Δ^{126} Chs3-Chs7 observamos una fuerte señal en la vacuola con apenas puntos en TGN/EE (**Figura 62B**, *chs5Δ*), una localización que coincidía con la mostrada por la proteína Δ^{126} Chs3-GFP en el mutante *chs5Δ* (**Figura 62C**). El conjunto de estos resultados sugiere que el complejo Δ^{126} Chs3-Chs7 es transportado directamente a la vacuola desde el TGN/EE en ausencia del exómero, a diferencia del complejo Chs3-Chs7 que queda retenido en el TGN/EE a través de su interacción con el complejo AP-1.

La explicación a estos resultados resulta obvia si tenemos en cuenta que la proteína Δ^{126} Chs3 carece de una de las señales que permiten la interacción de Chs3 con AP-1 (Starr et al., 2012; Weiskoff & Fromme, 2014) y que, de acuerdo con nuestros experimentos, esta proteína presenta un defecto en su interacción con las GGAs (**Figura 60C**). Ambas cosas resultarían en una deficiente retención de la proteína por estos adaptadores en el TGN/EE. Aunque en estas condiciones de falta de retención la proteína Δ^{126} Chs3 debería viajar a la MP por la ruta alternativa (Valdivia et al., 2002; Starr et al., 2012) como hace Chs3, esto no parece suceder teniendo en cuenta la localización de la proteína (**Figura 62C**) y la deficiente síntesis de quitina observada para Δ^{126} Chs3 en el mutante *chs5* Δ (**Figura A7, Anexo**).

Todos los resultados presentados arriba indicarían que, en ausencia de mecanismos específicos para la salida a la MP, léase exómero, o para la retención en el TGN/EE, léase AP-1/GGAs, la proteína Δ^{126} Chs3 sería muy eficientemente reclutada para su transporte directo a la vacuola, evitando mayoritariamente la vía alternativa hasta la MP. En el caso de la proteína silvestre Chs3, la apertura de la vía alternativa a la MP minimizaría este tráfico directo a la vacuola, que debe también existir al detectarse la típica señal vacuolar de Chs3 en el mutante del exómero, la cual no puede provenir de la vía endocítica debido al completo bloqueo de la proteína en el TGN/EE.

Desconocemos las razones por las que la proteína Δ^{126} Chs3 no puede seguir la vía alternativa a la MP de la misma forma que Chs3, así como los mecanismos implicados en el reclutamiento directo de Chs3 y Δ^{126} Chs3 para su tráfico directo desde el TGN/EE a la vacuola.

DISCUSIÓN GENERAL

1. El plegamiento de Chs3 se encuentra estrechamente regulado en el RE y depende de distintos dominios de la proteína.

El trabajo con las quimeras de Chs3 presentado en esta tesis ha llevado a proponer un modelo para las regiones implicadas en el plegamiento y, en consecuencia, en el QC de Chs3 en el RE (**Figura 37**). De acuerdo con este, el plegamiento de las distintas regiones de la proteína estaría siendo estrechamente controlado en el RE para asegurar que éste se produzca correctamente con el objetivo de lograr una proteína funcional que avance en la vía secretora hasta alcanzar su compartimento de destino, la MP. Entre estas regiones se encuentran los múltiples dominios TM de esta proteína politópica, su región luminal y su región citosólica central.

Defectos en el plegamiento/inserción de los dominios TM de Chs3 en la membrana del RE llevaban a su reconocimiento por el complejo Asi de INMAD actuando como degrones de tipo ERAD-M. La importancia de los dominios luminal y central era tal que incluso deleciones mínimas en estos, aun preservando el resto de la proteína completa, conducían a una fuerte retención en el RE de la proteína y a su reconocimiento efectivo por la maquinaria de ERAD/INMAD. Por un lado, defectos de plegamiento en la región citosólica central de la proteína eran reconocidos por el complejo Doa10 presentándose esta región como un degrón típico de ERAD-C. Por otro lado, el complejo E3 conformado por Hrd1 parecía estar controlando especialmente el plegamiento de la región luminal, ya fuese detectando deleciones de gran tamaño en esta región o defectos en la N-glicosilación de Chs3.

A diferencia de dichas regiones, el estudio con las quimeras en el N-terminal de Chs3 presentado en el capítulo II de Resultados reveló que la región N-terminal de la proteína no era necesaria ni para la salida del RE ni para la funcionalidad de Chs3 puesto que todas las quimeras alcanzaban la MP de forma similar a la proteína silvestre y eran capaces de sintetizar quitina. Si bien trabajo previo con la quimera Δ^{126} Chs3 había demostrado la implicación de esta región en la oligomerización de Chs3 (Sacristan et al., 2013), proceso sometido a un QC en el Golgi (Sacristan et al., 2013; este trabajo). En esta memoria hemos determinado también que la región del N-terminal de Chs3 comprendida entre los aminoácidos 26-125 tenía un papel en la retención en el RE de la proteína en ausencia de Chs7 probablemente asociado, de acuerdo con nuestros experimentos con DSP/DTT, a que la agregación de la proteína se veía favorecida en presencia de su dominio de oligomerización.

La región citosólica C-terminal de Chs3, aunque no se ha estudiado a fondo en este trabajo, ya había demostrado ser relevante para la funcionalidad de la proteína y para su llegada a la MP. En concreto los últimos 37 aminoácidos eran necesarios para la síntesis de quitina, al quedar la quimera Chs3 Δ^{37} retenida en el TGN/EE como consecuencia de los defectos de esta en la interacción con el exómero (Rockenbauch et al., 2012). El hecho de que esta quimera sin los últimos 37 aminoácidos sí que saliese del RE revelaba que dicha región no era importante para el plegamiento de la proteína en el RE, aunque sí lo fuese la región conformada por los últimos 4 dominios TM de Chs3.

2. La N-glicosilación de Chs3 regula el plegamiento de la proteína en el RE previniendo su acceso a ERAD/INMAD.

Aunque hasta ahora no se había detectado papel alguno de la N-glicosilación en el tráfico o funcionalidad de la proteína, nosotros ponemos aquí en evidencia la importancia de esta modificación postraducciona para el adecuado plegamiento de Chs3 en el RE. De acuerdo con el trabajo presentado en esta tesis, eliminar los sitios de N-glicosilación de Chs3 o de su quimera Fr2 conducía a una agregación superior de estas, agregación que facilitaba su reconocimiento por los sistemas de ERAD/INMAD. El reconocimiento de este defecto en N-glicosilación además parecía mucho más eficiente en el caso de que las proteínas quedasen retenidas en el RE como era el caso del Fr2, retenida *per se* en este compartimento, o el caso de Chs3 en los mutantes *chs7Δ* o *sec31-1*.

El trabajo con el Fr2^{QQQ} y Chs3^{QQQ} reveló asimismo que Hrd1 era el principal complejo E3 implicado en el reconocimiento de estas proteínas, que actuarían como sustratos de ERAD-L con un degrón luminal. Hemos demostrado también como eliminar la señal de N-glicosilación en una quimera que previamente no era sustrato de Hrd1 (pero sí de otras E3s), como era el caso del Fragmento 2 reconocido por el complejo Asi, reconducía la degradación de la proteína a este complejo en su totalidad, degradación además mucho más efectiva. Esto también ocurría en el caso del Fragmento 3a (Fr3a) que era sustrato de Doa10 y Asi cuando se encontraba glicosilado, pero pasaba a ser reconocido por Hrd1 y degradado mucho más eficientemente cuando eliminábamos su señal de N-glicosilación (resultados no mostrados).

Este papel prevalente como señalizador para la degradación de la carencia de N-glicosilación sobre el de otras señales de desplegamiento o factores se deducía también de los experimentos realizados con la proteína Δ^{126} Chs3^{QQQ}. El objetivo inicial de la construcción de esta proteína era ver qué ocurría cuando combinábamos un defecto en la N-glicosilación de la proteína con un defecto en la oligomerización, los cuales por separado en condiciones normales no daban lugar a una alteración importante del tráfico o de la función de la proteína. La microscopía realizada con la proteína Δ^{126} Chs3^{QQQ} mostró que, a diferencia de Chs3^{QQQ} (*CHS7*) y Δ^{126} Chs3, esta proteína se acumulaba en el RE (**Figura 63A**) y era reconocida por ERAD (**Figura 63B**) tanto en presencia como en ausencia de Chs7. De acuerdo con el análisis por separado de las proteínas Δ^{126} Chs3 y Chs3^{QQQ} llevado a cabo en este trabajo, todo apunta a que la proteína Δ^{126} Chs3^{QQQ} saldría del RE y sería reciclada desde el cis-Golgi (como la proteína Δ^{126} Chs3), pero al presentar ese defecto en N-glicosilación sería reconocida por la maquinaria de ERAD siendo así incapaz de evadir el ERQC. Al sobreexpresar Chs7, sin embargo, la proteína salía en parte a la MP donde era funcional al ser capaz de sintetizar quitina como se deducía de los resultados de los ensayos de resistencia a CW donde observábamos como al sobreexpresar la chaperona aumentaba considerablemente la sensibilidad a este compuesto (**Figura 63C**). Esta reversión al sobreexpresar su chaperona sugería un problema en la cinética de plegamiento de la proteína que conseguíamos superar al inclinar el balance a favor de los factores que contribuían a su plegamiento (chaperona) frente a aquellos que contribuían a su desplegamiento (carencia de N-glicosilación y defecto en oligomerización). Por lo tanto, en condiciones normales los niveles WT de Chs7 parecían suficientes para permitir la salida de Chs3^{QQQ} a pesar de su tendencia a agregarse, pero no de la proteína Δ^{126} Chs3^{QQQ} que seguramente debido a su intenso reciclado desde el cis-Golgi, consecuencia del defecto en oligomerización de la proteína (Sacristan et al., 2013),

sobresaturaba la capacidad de plegamiento de la chaperona que además sabemos que se encuentra en concentraciones limitantes (Trilla et al., 1999). Esto último pone de manifiesto el balance existente en el RE entre los mecanismos que favorecen el plegamiento de la proteína y los que favorecen su agregación y/o retención en el RE.

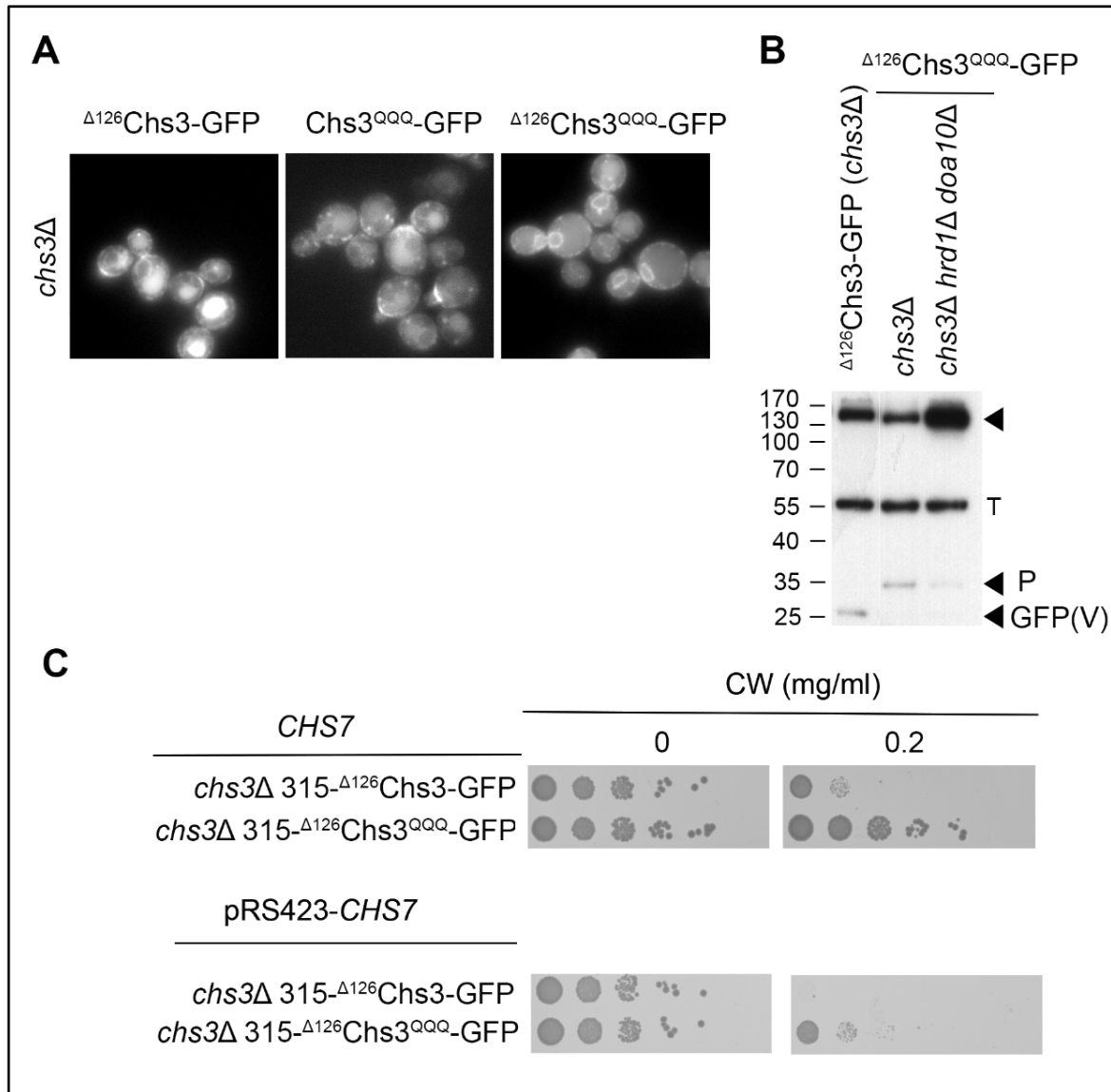


Figura 63. A) Localización de Δ^{126} Chs3-GFP, Chs3^{QQQ}-GFP y Δ^{126} Chs3^{QQQ}-GFP en una cepa *chs3* Δ . B) Western Blot de Δ^{126} Chs3-GFP en *chs3* Δ y de Δ^{126} Chs3^{QQQ}-GFP en *chs3* Δ y el doble mutante de ERAD (*chs3* Δ *hrd1* Δ *doa10* Δ). Nótese el procesamiento vacuolar de Δ^{126} Chs3-GFP frente al proteasomal en el caso de Δ^{126} Chs3^{QQQ}-GFP y el papel de ERAD sobre esta última. C) Ensayos de gota con Δ^{126} Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3^{QQQ}-GFP en *chs3* Δ (*CHS7* y 423-*CHS7*). Nótese cómo la sobreexpresión de *CHS7* revierte el fenotipo de resistencia a CW de la proteína Δ^{126} Chs3^{QQQ}-GFP.

En conclusión, en condiciones WT el efecto de eliminar esta señal de N-glicosilación no resulta relevante para el tráfico y la funcionalidad de la proteína a pesar de conducir a un cierto reconocimiento de la proteína por los sistemas de ERAD/INMAD. Sin embargo, un defecto en esta señal es determinante para el reconocimiento de la proteína por ERAD/INMAD cuando hay un problema adicional en el plegamiento (Fr2 y Fr3a), en la oligomerización de la proteína (Δ^{126} Chs3) y/o en la salida del RE (Chs3 en el mutante *chs7* Δ o *sec31-1*). Esto pone en evidencia como la combinación de distintas señales y factores que regulan el estado y conformación de Chs3 en el RE constituye la base para el QC de la proteína en el RE, lo cual indirectamente regulará si la proteína se degrada, se retiene, o bien avanza hacia compartimentos posteriores.

3. Modelo para el plegamiento de Chs3 en el RE.

Todo el trabajo presentado en esta memoria nos lleva a proponer el siguiente modelo para el plegamiento de Chs3 en el RE. De acuerdo con este, tras su síntesis en los ribosomas y translocación al RE, la inserción de los dominios TM de Chs3 en la membrana del RE sería monitorizada mediante la N-glicosilación de su dominio luminal. La N-glicosilación y el plegamiento adecuado de esta región luminal permitiría a la célula, en un primer momento, asegurarse de que la inserción de la proteína en la membrana del RE ha ocurrido correctamente para luego después proceder con el plegamiento de la región citosólica central y de la región conformada por los últimos 4 dominios TM de la proteína. En este punto Chs7 estaría al mismo tiempo contribuyendo a mantener a las hélices TM en una conformación adecuada en la membrana del RE, previniendo a su vez la agregación de la proteína y facilitando su posterior salida hacia el Golgi (Ver siguiente apartado). A mayores, hay que considerar que en el RE Chs3 debe oligomerizar a través de su extremo N-terminal (Sacristan et al., 2013) y ensamblarse con su chaperona para formar el correspondiente complejo Chs3-Chs7 (Este trabajo; Dharwada et al., 2018). Por todo esto, el plegamiento de Chs3 en el RE se presenta como un proceso realmente complejo.

Como hemos comentado con anterioridad, el dominio citosólico central y el dominio luminal de la proteína eran esenciales para permitir la salida de la proteína del RE, así como para prevenir el acceso de la proteína a ERAD/INMAD. El plegamiento de estos dominios estaría asimismo afectando al plegamiento e inserción de los dominios TM de la proteína a los que se encuentran asociados. Podemos distinguir 2 regiones de dominios TM en la proteína. Una conformada por los dos dominios TM iniciales que delimitan al dominio luminal y otra, más compleja con 4 dominios TM, hacia el final de la proteína. Asociada al plegamiento de esta última hemos visto un papel para la palmitoilación de Chs3, de manera que en ausencia de dicha señal parecía generarse un desplegamiento en estos dominios TM que conducía al reconocimiento de la proteína por los complejos Hrd1 y Asi (degrón de tipo ERAD-M). El papel de la palmitoilación en el plegamiento de Chs3 y su salida del RE había sido previamente demostrado (Lam et al., 2006), sin embargo, hasta la fecha no se había conseguido atribuir función alguna de esta modificación en la prevención del reconocimiento de Chs3 por la ruta UPS. Aunque el rol de la palmitoilación en la prevención de ERAD/INMAD no se había descrito, sí se había propuesto un papel de esta modificación en otro tipo de QC. Este es el caso de la proteína SNARE transmembrana Tlg1 que cuando no es palmitoilada

por Swf1 es reconocida por la E3 Tul1, que media su ubiquitinación en el Golgi para su posterior direccionamiento a la ruta del MVB (Valdez-Taubas & Pelham, 2005).

En su conjunto, todo apunta a que el plegamiento e inserción de los dos primeros dominios TM de la proteína se encuentra estrechamente regulado por el plegamiento del dominio luminal y su N-glicosilación, mientras que el de los 4 últimos viene determinado esencialmente por el plegamiento de la región citosólica central y por la palmitoilación de la proteína.

Una característica particular de Chs3 es la presencia de un dominio luminal que no se encuentra en el caso de otras proteínas politópicas con estructuras similares como es el caso de la celulosa sintasa o de las aminoácido permeasas (AAPs), las cuales además tampoco se encuentran aparentemente N-glicosiladas. Esto sugiere que el complejo plegamiento de Chs3 ha llevado evolutivamente a la aparición de este dominio para permitir monitorizar su plegamiento por etapas, a través de este y de su N-glicosilación, garantizando así la inserción y el correcto plegamiento de la proteína en el RE.

4. Chs7. Una chaperona peculiar.

El estudio realizado en este trabajo sugiere que Chs7 participa en el control de calidad de Chs3 de forma indirecta al facilitar la salida de Chs3 del RE y prevenir su retención y agregación en este compartimento, condiciones que facilitan el reconocimiento de la proteína por los sistemas de ERAD/INMAD. En el mutante *chs7Δ*, Chs3 daría lugar a la formación de unos agregados que impiden su salida del RE al constituir su tamaño un impedimento estérico para la carga de la proteína en las vesículas COPII. La interacción entre Chs7 y Chs3 facilitaría la formación de un complejo proteico exportable en vesículas COPII a través del receptor Erv14, con el cual el complejo interaccionaría, muy probablemente a través de la proteína Chs7, tal y como sugiere el análisis del tráfico independiente de esta chaperona (**Figura 47**).

Sin embargo, la agregación de Chs3 iría más allá de su falta de interacción con Chs7 ya que la oligomerización de la proteína a través de su dominio N-terminal parece favorecer este proceso. Así, el Fr1 que conserva esta región tiende a agregarse en acúmulos celulares cuya desagregación parece depender de la chaperona Hsp104 (**Figura 36**). Más importante, la eliminación de la región N-terminal al Fr2 y a Chs3 parece aliviar su agregación, lo que permite su salida del RE, incluso en ausencia de Chs7, por mecanismos alternativos de tipo *bulk flow*.

Chs7 funcionaría de forma similar a otras chaperonas específicas del RE como son Shr3, Gsf2 y Pho86 (**Figura 64A**), cuyos cargos son también proteínas politópicas: AAPs, Hxt1 y Pho84 respectivamente (Kota & Ljungdahl, 2005). Todas estas chaperonas facilitarían el correcto plegamiento de sus cargos previniendo su agregación y acumulación en el RE. Sin embargo, estas chaperonas no se encuentran conservadas a nivel de secuencia y los sistemas individuales presentan algunas características diferentes. Así, ni Shr3 ni Pho86 salen del RE (Kuehn et al., 1996; Lau et al., 2000), pero Gsf2 cicla entre el RE y el cis-Golgi gracias a un motivo dilisina que permite su reconocimiento en este último compartimento por COPI (Sherwood & Carlson, 1999). De acuerdo con nuestro trabajo Chs7 solo ciclaría entre el RE

y el Golgi en ausencia de Chs3, por lo que el reciclado de Chs7 al RE estaría mediado por señales que quedarían ocultas en el complejo Chs3-Chs7. Si se analiza la secuencia de Chs7 no se encuentra ningún motivo típico para el reconocimiento por COPI, lo cual concuerda con el papel observado para el receptor Erv46 en el reciclado de la proteína (**Figuras 50 y 51**).

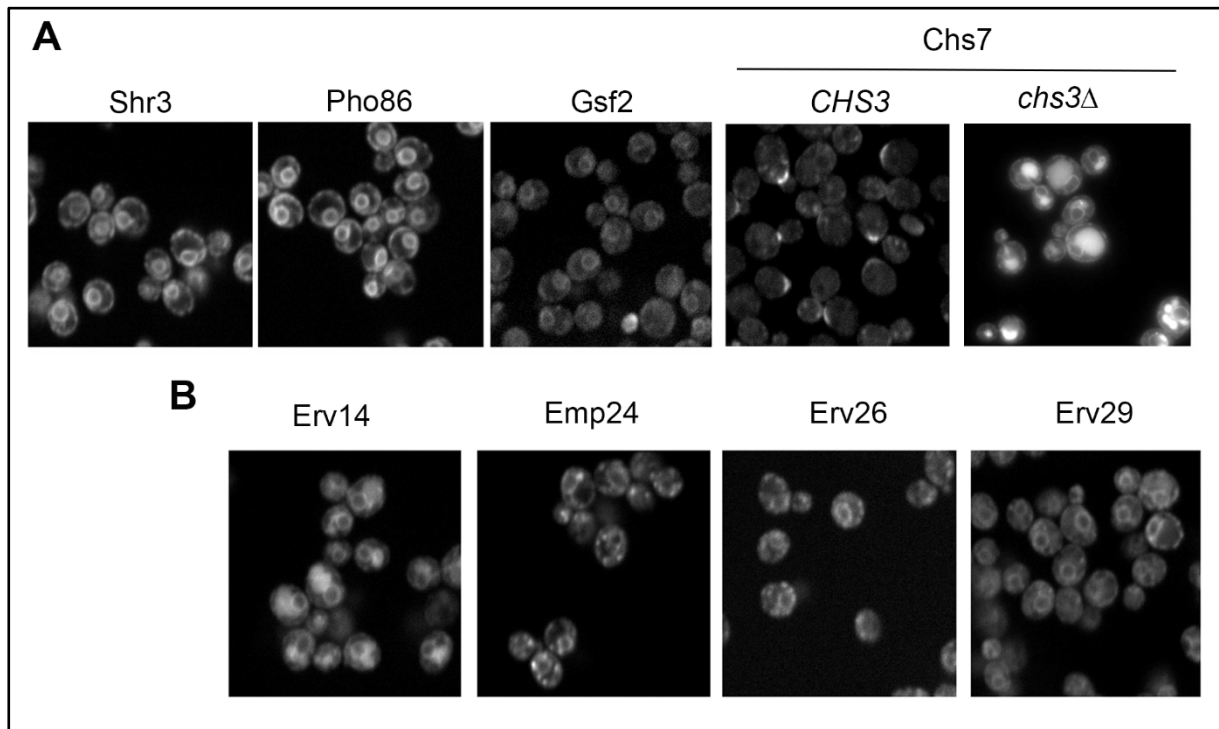


Figura 64. A) Localización en condiciones WT de las chaperonas específicas Shr3, Pho86, Gsf2 y de Chs7 (WT y *chs3Δ*). B) Localización de receptores de cargo Erv14, Emp24, Erv26 y Erv29 en condiciones WT (Fuente: SGD; excepto fotos de Chs7-SfGFP).

Esta chaperona, como se analizará en detalle en el siguiente punto, sigue una u otra ruta de tráfico dependiendo de si se encuentra o no formando un complejo con Chs3. En presencia de Chs3 sigue la ruta de la quitín sintasa, ampliamente descrita, unida a ella. Sin embargo, en ausencia de su cargo, Chs7 es capaz de salir eficientemente del RE en vesículas COPII de forma dependiente del receptor Erv14. Una vez en el cis-Golgi, la proteína es reciclada de vuelta al RE, aunque una parte consigue escapar a este QC y logra alcanzar por sí misma el TGN/EE desde donde es dirigida a la vacuola para completar su degradación a través de la ruta del MVB (Ver siguiente apartado).

Teniendo en cuenta que Chs7 es una chaperona específica para Chs3 con ningún otro cargo descrito hasta el momento, podemos intentar establecer un modelo para explicar los distintos resultados obtenidos. Según este modelo, y considerando que Chs7 se expresa en cantidades limitantes (Trilla et al., 1999; Sacristan et al., 2013), en condiciones normales toda la proteína se ensamblaría con Chs3, siguiendo su tráfico conjuntamente a lo largo de la vía secretora. En estas condiciones no sería necesario su reciclado en vesículas COPI ni una vía directa a la vacuola, ya que Chs7 acabaría siendo degradada en la vacuola a través de la vía endocítica junto a su cargo, Chs3. Si Chs7 estuviera en exceso, una parte de la proteína

podría salir del RE independientemente de Chs3, llegando al Golgi desde donde este exceso se estaría reciclando mayoritariamente en vesículas COPI; sin embargo, este proceso de reciclado acabaría saturándose y la proteína podría ser eventualmente degradada en la vacuola a través de una vía alternativa directa que partiese desde el TGN/EE. Este modelo posicionaría a Chs7 como una proteína propia del RE, con sus mecanismos específicos de reciclado, lo que es compatible con su papel como chaperona de Chs3. Igualmente, este modelo conciliaría las evidencias previas que localizaban a Chs7 en el RE, frente a las más recientes que la posicionan en la localización de Chs3 en condiciones WT (*CHS3*) y en RE y vacuola en el mutante *chs3Δ*. Los distintos resultados podrían así ser explicados por los distintos niveles de expresión de Chs7 utilizados en las correspondientes aproximaciones experimentales; la expresión desde un plásmido (Trilla et al., 1999) que, aunque centromérico, produciría niveles más altos de la proteína que los que se producen a partir de su locus genómico (Dharwada et al., 2018; este trabajo).

Podemos pensar también que Chs7 se estaría comportando de forma similar a como lo hacen las AAPs cuando no son necesarias, pero en este caso a la inversa. Estas AAPs son dirigidas, tras su síntesis, desde el TGN a la vacuola en una ruta mediada por el ESCRT, algo que solamente ocurre cuando sus cargos, los aminoácidos, se encuentran en cantidades suficientemente altas (revisado en Bianchi et al., 2019). Por otra parte, la ruta seguida por Chs7 sería distinta a la macroautofagia constitutiva descrita para el exceso de proteínas TM del RE (Lipatova et al., 2020).

Un punto importante por discernir es cuan general es el comportamiento de Chs7 descrito aquí. Chs7 forma parte de un grupo de proteínas definidas como chaperonas integrales de la membrana del RE entre las que se incluyen clásicamente las ya mencionadas Shr3, Gsf2 y Pho86, pero entre las cuales también pueden incluirse los receptores de cargo del RE Erv14, Emp24, Erv26 y Erv29. Teniendo en cuenta lo descrito hasta ahora para Chs7, el primer interrogante que surge es si estas proteínas tienen un comportamiento similar al de esta chaperona. La base de datos SGD (*Saccharomyces* Genome Database) nos proporciona información fiable sobre la localización de estas proteínas (**Figura 64**), mostrando que todas ellas, salvo Chs7 (*CHS3*), se localizan mayoritariamente en el RE en condiciones WT. Sin embargo, cuando eliminamos el único cargo conocido para Chs7, Chs3, esta muestra una localización compartida entre el RE y la vacuola, muy similar a la observada para Erv14 (**Figura 64B**). Esto último sugeriría que Erv14 podría tener un comportamiento similar a Chs7. Por lo tanto, un posible objetivo futuro sería intentar confirmar esta ruta de tráfico para Erv14, lo que tendría gran relevancia teniendo en cuenta el papel de Erv14 como receptor de cargo de numerosas proteínas TM (Herzig et al., 2012).

5. La monitorización de la formación del complejo Chs3-Chs7 y de la oligomerización de Chs3 se realiza a múltiples niveles en la vía secretora e influye en la localización de ambas proteínas.

De acuerdo con Dharwada et al. (2018) y el trabajo presentado en esta memoria, Chs3 y su chaperona Chs7 parecen viajar unidas formando el complejo Chs3-Chs7 a lo largo de la ruta secretora, en un camino ampliamente descrito para la quitín sintasa (Valdivia et al., 2002; Copic et al., 2007; Rockenbauch et al., 2012; Huranova et al., 2016). El tráfico anterógrado conjunto de estas proteínas queda ampliamente demostrado por los resultados presentados; sin embargo, todavía no hemos podido demostrar experimentalmente si tras su llegada a la MP Chs3 y Chs7 se endocitan también de forma conjunta para su posterior reciclaje y degradación por la ruta del MVB, aunque todo parece indicar que así lo hacen. El hecho de que una chaperona acompañe en toda su ruta de tráfico a su cargo es algo sin precedentes en la bibliografía. Sin embargo, sí que hay algunos precedentes, aunque limitados, en el caso del tráfico dependiente de proteínas en complejos proteicos. Este es el caso, por ejemplo, del complejo encargado del transporte de hierro en levaduras, constituido por la oxidasa Fet3 y su permeasa Ftr1, para el cual se ha descrito la dependencia mutua de estas proteínas en su transporte a la MP, de manera que cuando una u otra se encuentran desensambladas se acumulan en el RE (Singh et al., 2006).

El fundamento de que Chs3 necesite a Chs7 para su tráfico a lo largo de la vía secretora podría encontrarse en el papel descrito para esta chaperona (Kota & Ljungdahl, 2005) en la prevención de interacciones inapropiadas entre los dominios TM de su cargo cuando este se inserta en la membrana, así como en su posible capacidad para facilitar la interacción de Chs3 con otros componentes de su ruta de tráfico. Debido a la importancia señalada en este trabajo de los dominios TM de Chs3 en su plegamiento, es posible que Chs7 sea necesaria para mantener la adecuada inserción y conformación de estos dominios en cada una de las membranas características de cada compartimento de la ruta secretora. Chs7 estaría contribuyendo de este modo a que Chs3 mantuviese su funcionalidad en toda la vía asegurando asimismo el tráfico adecuado de esta a la MP al facilitar la interacción de Chs3 con el exómero, y previniendo así su acceso a otras vías de QC destinadas a su degradación.

Los resultados que se presentan en esta memoria nos han permitido no solo confirmar el modelo para el tráfico de Chs7 en el complejo Chs3-Chs7 propuesto por Dharwada et al. (2018) (**Figura 56**), sino también proponer por primera vez un modelo para el tráfico de esta chaperona cuando esta se encuentra en forma de subunidad huérfana (**Figura 57**). Una herramienta esencial en este estudio ha sido la proteína Δ^{126} Chs3, ya que al poder salir del RE independientemente de Chs7 nos ha permitido analizar el papel de esta chaperona a lo largo de toda la ruta secretora, más allá de su función como chaperona en el RE.

Del trabajo realizado con estas proteínas, Δ^{126} Chs3 y Chs7, se infiere que tanto el adecuado ensamblaje del complejo Chs3/ Δ^{126} Chs3-Chs7 como la correcta oligomerización de la proteína son monitorizados a lo largo de la vía secretora por distintos procesos o mecanismos de QC. Por un lado, el hecho de que tanto Chs3 como Chs7 accediesen a ERAD/INMAD y además a la vacuola en el caso de Chs7 cuando no formaban un complejo entre ellas, sugería que existía un control de calidad del ensamblaje del complejo que conducía a la degradación de las subunidades desensambladas en el RE y/o en la vacuola.

Por otro lado, que Chs3 accediese a ERAD/INMAD en ausencia de su chaperona era algo que recordaba a lo que pasaba con Gap1 y su chaperona específica Shr3 (Kota et al., 2007). Si bien Gap1 no forma un complejo con Shr3 y en el mutante *shr3Δ* accede a los complejos Hrd1 y Doa10, a diferencia de Chs3 que solo es reconocida en el mutante *chs7Δ* por el complejo Asi, un complejo al cual se le han atribuido funciones en la degradación de subunidades de complejos desensambladas (Natarajan et al., 2020). La salida del RE de Chs7 en ausencia de Chs3 parecía ocurrir de la misma forma que en condiciones WT, es decir, en vesículas COPII y de forma dependiente del receptor Erv14. Chs7 cuenta con un motivo DxE para su reconocimiento por COPII en su cola C-terminal, pero este no había mostrado ser determinante para su salida del RE (Dharwada et al., 2018). Por lo tanto, es posible que Chs7 interaccione de forma dual con Erv14 y COPII constituyendo esa señal bipartita la que facilite su salida del RE. Este modelo de interacción con Erv14 y COPII ya había sido propuesto para otras proteínas TM como Gap1 o Yor1 (Pagant et al., 2015).

Gracias al trabajo con la quimera Δ^{126} Chs3 que nos permitía estudiar el papel de Chs7 sobre Chs3 con independencia de su función en el RE, observamos que el adecuado ensamblaje del complejo también era chequeado en el cis-Golgi. Rer1 y Erv46 en el caso de Δ^{126} Chs3 (*chs7Δ*) y principalmente Erv46 en el caso de Chs7 (*chs3Δ*) reconocían a estas proteínas cuando se encontraban desensambladas permitiendo su reciclado en COPI. En este punto, la propia oligomerización de la proteína parecía a mayores ser supervisada incluso en presencia de Chs7. Así, mientras que el reconocimiento de la quimera en ausencia de Chs7 se producía a través de interacciones entre esta y los receptores Rer1 y Erv46, en presencia de la chaperona parecían ser necesarias tanto señales presentes en Chs7 como la señal dilisina presente en la quimera para el reciclado en COPI (**Figuras 58 y 59**) en un proceso que también parecía implicar al receptor Erv46, pero no a Rer1. En el caso de Erv46 además se daba la peculiaridad de que este receptor era capaz de reconocer por separado tanto a Chs7 como a la quimera Δ^{126} Chs3 con independencia de que estos formasen un complejo, lo que sugería que ambas proteínas debían estar exponiendo señales para el reconocimiento por dicho receptor que no se encontraban ocultas en el complejo. El caso contrario se daría para Rer1 en el caso de la quimera, ya que este receptor solamente era capaz de reconocer a Δ^{126} Chs3 en ausencia de Chs7, por lo que estaría reconociendo señales en esta proteína que quedarían expuestas únicamente cuando el complejo no se forma. Esto último es lo que ocurre en el caso de Fet3 cuando se encuentra desensamblada, sin formar el complejo Fet3-Ftr1, de manera que se ha visto que determinados residuos polares en sus dominios TM quedan expuestos en ausencia del complejo y estos son los causantes de su interacción con Rer1 (Sato et al., 2004) que media su reciclado en COPI de vuelta al RE. Puesto que tanto el ensamblado del complejo entre Chs3/ Δ^{126} Chs3 y Chs7 como la propia oligomerización de Chs3 son procesos que tiene lugar en el RE, pensamos que dicho reciclado tiene como objetivo proporcionar una segunda oportunidad para el ensamblado del complejo y/o la oligomerización de la proteína.

Más aún, nuestro trabajo muestra que cuando alguna de las subunidades sueltas del complejo consigue evitar dichos pasos previos de QC, estas se encuentran sometidas a un QC adicional en el TGN/EE que se basa en su direccionamiento a la vacuola en vías alternativas que no implican el paso de estas proteínas por la MP, pero sí su procesamiento definitivo por el ESCRT en la ruta del MVB (Ver siguiente subapartado).

El hecho de que existan múltiples puntos en la vía secretora para controlar el adecuado ensamblaje del complejo y la oligomerización de la proteína pone en evidencia la importancia de estos procesos para el adecuado tráfico de estas proteínas y, por lo tanto, para su funcionalidad. Más importante, esto constituye un ejemplo perfecto de cómo los distintos mecanismos de QC de la célula cooperan y se complementan en sus funciones y señala a Chs3 como un modelo excepcional para estudiar el tráfico y control de calidad de complejos de proteínas en la célula, un campo apenas explorado.

5.1. Rutas alternativas a la vacuola como un mecanismo de QC en el TGN/EE.

Las rutas alternativas a la vacuola que siguen tanto Chs7 como la quimera Δ^{126} Chs3 cuando estas no forman el correspondiente complejo Chs7-Chs3/ Δ^{126} Chs3 no han sido descritas previamente, lo que destaca la importancia de este estudio. Dichas vías alternativas, de acuerdo con nuestros datos, no implican el paso de sus cargos por la MP, pero sí precisan del ESCRT y, por lo tanto, de la ruta del MVB para el procesamiento vacuolar de estos. Al mismo tiempo, constituirían un control de calidad adicional en el TGN/EE para proteínas desensambladas o que ven bloqueada su salida a su compartimento de destino (Ver siguiente subapartado). Es importante señalar aquí que no podemos descartar que estas vías se estén dando también en condiciones silvestres, aunque sea de una forma marginal, y que al solaparse estas con la ruta mayoritaria de transporte de la proteína seamos incapaces de visualizarlas.

La vía alternativa a la vacuola que seguía Chs7 en ausencia de Chs3/ Δ^{126} Chs3 dependía de las GGAs y del ESCRT, aunque ésta no requería del receptor Vps10 por lo que no se correspondía con la típica ruta CPY ni con el QC descrito en el Golgi para este receptor (revisado en Sun & Brodsky, 2019). En este punto sería interesante ver si existe un receptor específico para la interacción de Chs7 con las GGAs o si el reconocimiento se produce de forma directa a través de señales presentes en la chaperona. En esta vía además parecía existir un papel directo de Ubp3 asociado a la desubiquitinación de algún componente del sistema. No podemos descartar totalmente que Ubp3 desubiquitine directamente a Chs7, pero la función bastante general de Ubp3 en la desubiquitinación sugiere que muy probablemente su efecto se produzca a través de la desubiquitinación de algún componente esencial para la ruta de tráfico alternativo a la vacuola de Chs7.

No hemos sido capaces de identificar de momento ningún factor temprano del TGN/EE implicado en el tráfico de la proteína Δ^{126} Chs3 hasta la vacuola en ausencia de Chs7, aunque hemos podido descartar las vías clásicas de transporte a la vacuola, las rutas AP-3, CPY y autofagia, además del posible papel de Tul1 (GQC) y las GGAs, quedando pendiente el análisis de las epsinas, ya implicadas previamente en la retención de Chs3 en el TGN/EE (Copic et al., 2007).

Una hipótesis muy atractiva sería la potencial ubiquitinación de Chs3-Chs7 en el TGN/EE, señal que podría actuar como un indicador del estado del ensamblaje del complejo en este compartimento y que, por lo tanto, podría permitir regular su control de calidad en el Golgi (GQC), el cual a su vez determinaría el destino final de la proteína. La ubiquitinación en el TGN ya se había propuesto como un mecanismo para el GQC de otros cargos como es el

caso de distintas proteínas desplegadas que eran reconocidas en este compartimento y dirigidas a la vacuola tras su ubiquitinación (revisado en Sun & Brodsky, 2019). Sabemos que Chs3 está ubiquitinada en su extremo N-terminal y que esta ubiquitinación marca a la proteína para su degradación en la vacuola, pero también sabemos que esta ubiquitinación ocurre en la MP y es mediada por el módulo Art4/Rsp5 (Arcones et al., 2016). Por lo tanto, desconocemos si esta proteína puede ser ubiquitinada en el TGN/EE por el mismo módulo o por otros.

Nuestro trabajo revela que el tráfico alternativo de Δ^{126} Chs3 (*chs7* Δ) a la vacuola no se veía aparentemente comprometido en una versión de la proteína mutada en 12 de sus lisinas potencialmente ubiquitinables (Δ^{126} Chs3^{12K}), lo que parecía descartar el papel de la ubiquitinación en este tráfico. Sin embargo, el importantísimo papel que juega la ubiquitinación en el reconocimiento por el complejo ESCRT no nos permite descartar totalmente la posibilidad de que existan otras lisinas de la proteína que se estén ubiquitinando. Queda por tanto analizar directamente el papel de los distintos módulos ART/Rsp5 en este tráfico.

5.2. La interacción efectiva con el exómero depende de ambos componentes del complejo Chs3-Chs7.

El análisis del tráfico independiente de la quimera Δ^{126} Chs3 ha permitido estudiar el potencial papel de la chaperona Chs7 en el tráfico de Chs3 desde el TGN/EE. De este análisis se deduce claramente que Chs3 precisa de Chs7 y viceversa para su interacción con el exómero. Por lo tanto, todo apunta a que tanto Chs3 como Chs7 aportan señales que en conjunto son necesarias para la formación de un complejo Chs3-Chs7-Exómero competente para el exporte a la MP. Aunque ya se han descrito distintos motivos en el N-terminal y C-terminal de Chs3 para su interacción con el exómero (Starr et al., 2012; Rockenbauch et al., 2012), faltarían por esclarecer los motivos presentes en Chs7.

En las **Figuras 65 y 66** se representa esquemáticamente el tráfico de la proteína Δ^{126} Chs3 en diferentes condiciones, centrándonos fundamentalmente en el tráfico desde el TGN/EE de esta proteína, aunque en esta figura también se muestra el tráfico de la quimera en otros compartimentos, descrito en apartados previos de esta discusión.

En presencia de Chs7, la proteína forma el correspondiente complejo que al llegar al TGN/EE es capaz de interactuar con el exómero viajando de forma polarizada a la MP, garantizándose así la síntesis de quitina (**Figura 65A**). En ausencia del exómero, la única vía posible de tráfico a la MP sería la alternativa (Valdivia et al., 2002), sin embargo, la proteína Δ^{126} Chs3, a pesar de no poder interactuar con AP-1 (Starr et al., 2012; Weiskoff & Fromme, 2014) ni GGAs (**Figura 60C**), no parece ser capaz de dirigir al complejo Δ^{126} Chs3-Chs7 hasta la MP por la vía alternativa ya que no es capaz de revertir la resistencia a calcoflúor del mutante del exómero (**Figura A7**, Anexo). En este caso la proteína en el complejo es reconocida en el TGN/EE para su tráfico directo a la vacuola (**Figura 65B**).

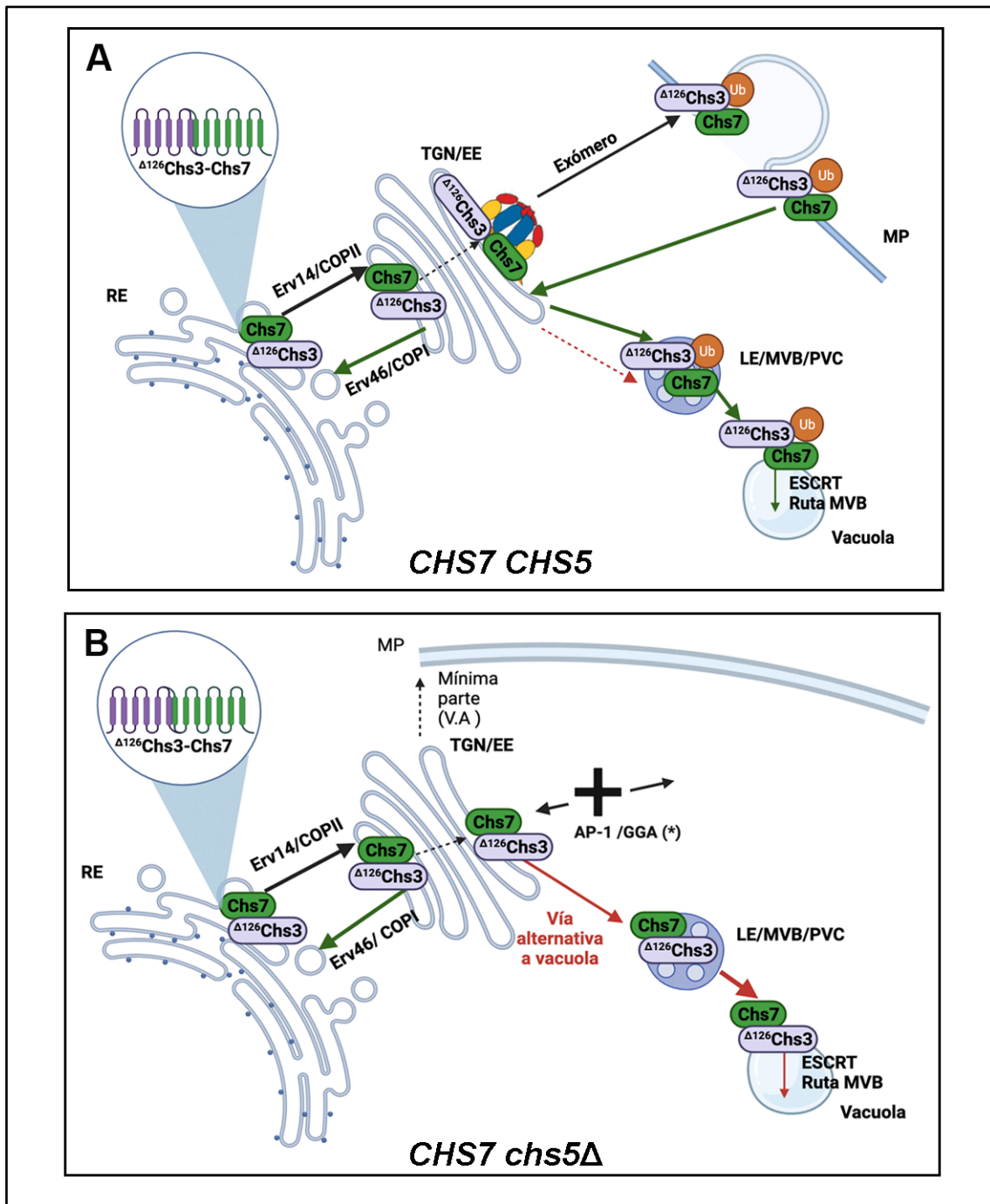


Figura 65. Tráfico de $\Delta^{126}\text{Chs3}$ en cepas *CHS7* en presencia (A)/ausencia (B) del exómero.

En ausencia de *Chs7*, $\Delta^{126}\text{Chs3}$ llega de forma independiente al TGN/EE, pero al no estar *Chs7* no puede interactuar con el exómero, lo que impide su llegada a la MP, siendo dirigida a la vacuola (**Figura 66A**). En este caso, la presencia o ausencia del exómero no sería relevante en el tráfico de la proteína debido a su incapacidad para interactuar con este en el mutante *chs7 Δ* .

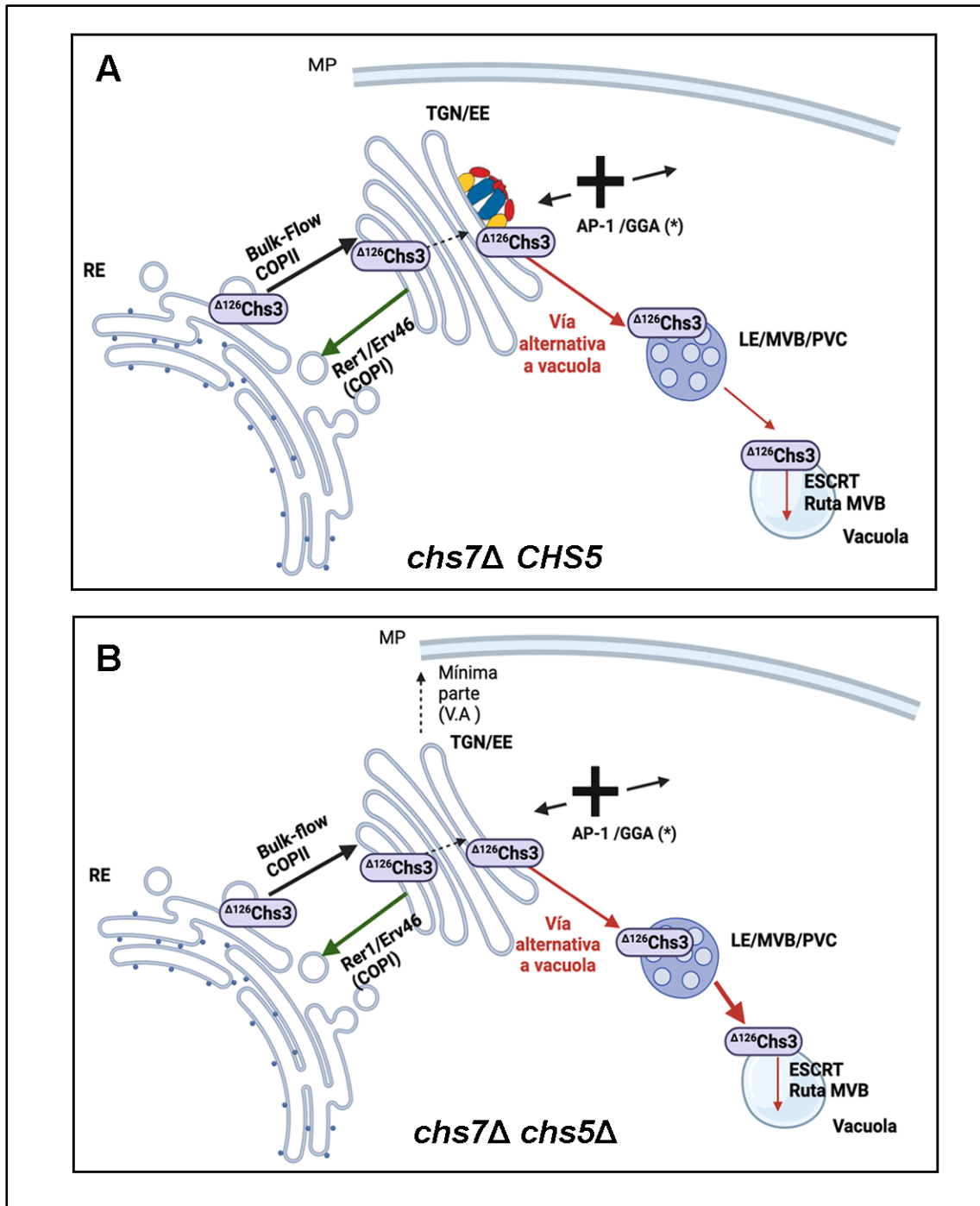


Figura 66. Tráfico de Δ^{126} Chs3 en el mutante *chs7 Δ* en presencia (A)/ausencia(B) del exómero.

No se puede descartar tampoco que en el mutante del exómero (*CHS7*, *chs7 Δ*) una mínima parte de la quimera llegue a la MP por la vía alternativa teniendo en cuenta los defectos que presenta esta en su interacción con AP-1 y las GGAs y la dificultad para detectar por microscopía pequeñas cantidades de la proteína a lo largo de la MP (**Figura 65B**, **Figura 66B**).

Creemos que la proteína Chs3 seguiría las mismas pautas de transporte que la quimera en el mutante *chs7Δ*, algo difícil de demostrar debido a la retención de Chs3 en el RE en ausencia de su chaperona. Sin embargo, en el caso de que pudiese salir lo lógico es pensar que Chs3, al no ser capaz de interactuar con el exómero en ausencia de Chs7, terminase accediendo a la vía alternativa a la vacuola que sigue la quimera ya que además en este caso Chs3 no podría salir, en ningún caso, por la vía alternativa a la MP al mantener la retención por AP-1 en el TGN/EE en el mutante *chs5Δ* (Anton-Plagaro et al., 2021). En presencia de Chs7, el complejo Chs3-Chs7 interactuaría preferentemente con el exómero que mediaría su salida polarizada a la MP. Si el exómero no se encontrase presente, AP-1 retendría a Chs3-Chs7 en el TGN/EE impidiendo su salida a la MP por la vía alternativa, aunque esta retención no bloquearía completamente la ruta directa a la vacuola ya que las proteínas Chs3 y Chs7 son visualizadas en parte en la vacuola incluso en el mutante *chs5Δ* (**Figura 62C**).

CONCLUSIONES

1. El plegamiento de Chs3 se encuentra estrechamente controlado en el RE, siendo monitorizado a dos niveles, a través de su dominio luminal y de su dominio citosólico central. Defectos en el plegamiento de cualquiera de estos dominios conducen a la retención en el RE y a un reconocimiento de la proteína por la maquinaria de ERAD/INMAD.
2. La N-glicosilación del dominio luminal de Chs3 permite monitorizar la inserción y el plegamiento inicial de la proteína en el RE, actuando como una especie de blindaje preventivo frente a ERAD/INMAD. El papel señalizador de la ausencia de N-glicosilación para el reconocimiento por la ruta UPS parece deberse a la mayor agregación de la proteína en esta condición, la cual desencadenaría su reconocimiento por los sistemas de ERAD/INMAD.
3. El plegamiento del dominio citosólico central de Chs3 junto con el de sus dominios TM adyacentes es controlado independientemente por la célula, actuando como un mecanismo de control adicional que contribuiría a garantizar la funcionalidad de la proteína.
4. Las proteínas Chs3 y Chs7 forman un complejo proteico en el RE que se mantiene a lo largo de la vía secretora. La formación de este complejo garantizaría su salida en vesículas COPII a través de la interacción de Chs7 con el receptor Erv14. El ensamblaje del complejo es monitorizado como parte del plegamiento de Chs3 y defectos en este proceso conducen al reciclado en vesículas COPI. Igualmente, la formación del complejo es imprescindible para su apropiado reconocimiento por la maquinaria del TGN/EE, que indirectamente previene su desvío a la vacuola para su degradación.
5. Chs7 parece actuar como una proteína dual; por un lado, formando parte del complejo Chs3-Chs7, y por otro constituyendo una chaperona residente en el RE. De acuerdo con este último papel, Chs7 puede ser independientemente reciclada desde el Golgi temprano en vesículas COPI y su exceso es eliminado en la vacuola mediante una vía directa desde el TGN/EE que depende de los adaptadores GGAs.
6. Chs3 requiere de su ensamblaje con Chs7 para su salida del RE, sin embargo, la quimera de Chs3 deficiente en su oligomerización, Δ^{126} Chs3, es capaz de salir independientemente del RE por un mecanismo de *bulk flow*, estando sometida también a reciclado por vesículas COPI en lo que supone un QC para esta proteína en el Golgi temprano. La proteína Δ^{126} Chs3 que no se recicla o que acaba evadiendo dicho control es eliminada en la vacuola por una vía directa desde el TGN/EE que parece distinta a la que sigue Chs7.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Para la realización de este trabajo se ha empleado la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La mayor parte de las cepas se han construido sobre un fondo genético W303, con la excepción de algunos mutantes termosensibles, las cepas utilizadas como “*queries*” para la búsqueda masiva cuyo fondo genético era Y8205 y las librerías de mutantes de la UPS y del genoma completo cuyo fondo era BY4741/3. Las cepas utilizadas se detallan en la tabla 2 del anexo.

Los mutantes de delección se construyeron empleando la técnica de reemplazamiento génico en un solo paso (Rothstein, 1983). En esta técnica se aprovecha el proceso de recombinación homóloga que tiene lugar en la levadura tras realizar una transformación con los casetes de delección necesarios en cada caso siguiendo el protocolo de transformación estándar basado en el uso de acetato de litio y polietilenglicol (AcLi/PEG). Todas las transformaciones llevadas a cabo en este trabajo ya fueran con plásmidos o casetes se llevaron a cabo con dicho protocolo (Schiestl & Gietz, 1989).

Adicionalmente, se llevó a cabo el marcaje directo en el genoma de algunas proteínas en su extremo C-terminal con epítomos/tags como la GFP, SuperfolderGFP (SfGFP), mCherry, mRuby2, HA, los fragmentos N/C-terminal de la VENUS o el tándem mCherry-SuperfolderGFP. Dichos tags fueron obtenidos por amplificación desde los plásmidos molde correspondientes (serie pFA6a en su mayoría) generándose un casete que incluía dicho tag y un marcador que permitía su posterior selección tras la transformación de la levadura.

Los casetes utilizados en las transformaciones se basan en el uso de dos tipos distintos de marcadores de selección: (1) la resistencia a las drogas nourseotricina (*natMx4*), higromicina (*hphNT1*) o kanamicina/ geneticina/ G418 (*kanMx4*), o bien (2) la adquisición de un gen que confiere la capacidad de sintetizar un cierto aminoácido. Los casetes empleados en este trabajo se construyeron mediante amplificación por PCR de dichos marcadores de selección usando como molde los plásmidos pUG6 (*kanMx4*), pAG25 (*natMx4*), pFA6a::*hphNT1*, pRS303 (*HIS3*), pUG72 (*URA3*) o pUG73 (*LEU2*). El marcador, en el caso de los casetes de delección, quedaba flanqueado por las regiones 3' y 5' no codificantes del gen de interés (de aproximadamente 50 pb cada una), que se encontraban contenidas en los oligonucleótidos empleados para la amplificación. Estas regiones no codificantes permitían la integración del casete en el lugar de interés del genoma tras la recombinación homóloga producida en la transformación. En el caso de los casetes para el marcaje de proteínas en el C-terminal, los oligonucleótidos para la síntesis del casete contenían en su secuencia además de regiones solapantes sobre los plásmidos molde que contenían el tag y el marcador, secuencias homólogas al C-terminal de la proteína que permitían la integración del casete en el C-terminal de la ORF tras la recombinación homóloga producida en la transformación. Los transformantes obtenidos se comprobaron mediante PCR con oligonucleótidos externos que permitieran comprobar que dicha integración se había producido en el locus correspondiente. En caso necesario, la inserción fue verificada mediante secuenciación directa del correspondiente fragmento genómico.

Por otro lado, para realizar los experimentos de clonación molecular se utilizaron estirpes de *Escherichia coli* (Tabla 4, Anexo).

2. MEDIOS DE CULTIVO.

2.1. Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

El medio utilizado para el cultivo de *E.coli* fue LB (Luria-Bertani medium) el cual se compone de extracto de levadura (0.5%), triptona (1%) y NaCl (1%). Para las placas se añade también agar al 2%. Estos medios se suplementaron con ampicilina (50 µg/ml para líquidos y 100 µg/ml para sólidos) o con kanamicina (20 µg/ml) para seleccionar los clones portadores del gen de resistencia al antibiótico correspondiente. Los cultivos se crecieron a 37°C y la conservación de las cepas se llevó a cabo a -80°C en glicerol al 50%.

2.2. Medios de cultivo para *Saccharomyces cerevisiae*.

Los medios que se emplearon para el crecimiento de *S.cerevisiae* fueron YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose: 1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa) y medio sintético definido o SD (Synthetic-Dextrose: 0.7% de YNB o Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y glucosa al 2%). El medio SD se suplementa con una mezcla de los 20 aminoácidos proteínógenos junto con otros nutrientes. Para el trabajo en el laboratorio se añaden todos los aminoácidos excepto aquellos que queremos utilizar como presión selectiva para la selección de transformantes (SD-aminoácido/s). Para los medios sólidos se añadió agar al 2%.

El crecimiento de las cepas se llevó a cabo a 28°C en matraces de cultivo, tubos en agitación o en placas. Sin embargo, los mutantes termosensibles se crecieron a 25°C cambiando a la temperatura restrictiva de 37°C durante un determinado tiempo para ver el correspondiente efecto de pérdida de función.

El crecimiento de los cultivos se controló midiendo la absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro. El número de células por mililitro se estimó mediante comparación con una recta patrón, obtenida representando el número de células contadas en una cámara Thoma frente a la absorbancia a 600 nm ($DO_{600}=1$ se corresponde aproximadamente con $1-2 \times 10^7$ células/ml). Los cultivos se recogieron para su procesamiento/visualización en fase logarítmica ($DO=0.7-1$).

La conservación de los cultivos una vez crecidos se realizó en placas de medio sólido que se conservaron en torno a 4°C durante un máximo de 30 días. Para el almacenamiento a largo plazo las cepas se congelaron a -80°C en glicerol al 15%.

2.3. Medios suplementados con drogas/inhibidores.

Para los ensayos de inhibición del proteasoma se crecieron los cultivos en medio SD sin el correspondiente aminoácido (normalmente leucina al estar nuestras proteínas en plásmidos pRS315). En estos experimentos, que se detallarán en el apartado 6, parte del cultivo se trataba con DMSO (control, *Sigma*) y la otra parte con el inhibidor del proteasoma MG-132 (*Sigma*; concentración final de 75 μ M). Tras la media hora de incubación con estos compuestos se inhibía la síntesis de proteínas usando cicloheximida a 100 μ g/ml (*Sigma*).

En los experimentos de cinéticas con cicloheximida también se utilizó este compuesto a 100 μ g/ml en el medio correspondiente.

En los experimentos para evaluar la autofagia se usó rapamicina para inducir este proceso (control). Esta droga se añadía al cultivo en fase logarítmica a una concentración de 200 ng/ μ l, incubando posteriormente este durante 3 horas y media a 28°C antes de la recogida de muestra.

Los ensayos de resistencia a calcoflúor se realizaron en placas de YEPD o SD suplementadas con dicho antifúngico a las concentraciones finales indicadas en cada caso. El medio SD se tamponó con biftalato potásico 50 mM a pH 6.2 para evitar la precipitación del calcoflúor. Para evaluar resistencia a este compuesto se realizaron ensayos de gota partiendo de cultivos recogidos en fase logarítmica disueltos en agua y ajustados a una $DO_{600} = 1$. Para estos ensayos se hicieron diluciones 1/10 sucesivas y con un replicador se depositaron las gotas sobre las placas a las distintas concentraciones de calcoflúor (Trilla et al., 1999). Para la tinción con calcoflúor se crecían los cultivos en YEPD y tras refrescar y alcanzar la fase logarítmica se añadía el calcoflúor a una concentración de 10 mg/ml y se procedía a la visualización después de unos 40 minutos mínimo de incubación con la droga.

Para los experimentos de inhibición de la endocitosis se utilizó la droga despolimerizante de actina, latrunculina A, disuelta en DMSO a una concentración final de 30 μ M en el medio correspondiente (Reyes et al., 2007), incubándose durante al menos 20 minutos el cultivo con dicha droga.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

3.1. Extracción de ADN.

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se llevó a cabo por el método de lisis alcalina (Zhou et al., 1990). Para la purificación del ADN se utilizó el kit *NZYMiniprep* (*nzytech*).

La extracción de ADN genómico/total de la levadura se llevó a cabo mediante una extracción con fenol/cloroformo/isoamílico (Cheng & Jiang, 2006). Este proceso se utilizó para comprobar la obtención de mutantes/marcajes con epítomos mediante una PCR posterior en la que se usa ese ADN genómico como molde, o bien para recuperar y amplificar plásmidos de interés mediante electroporación de *E.coli* con ese ADN genómico/total.

3.2. Procesamientos enzimáticos del ADN.

Los tratamientos enzimáticos que se realizaron sobre el ADN en los distintos experimentos llevados a cabo en la tesis son:

- Digestiones con endonucleasas de restricción.
- Ligaciones usando la ligasa del fago T4 (*Thermo Scientific*).
- Creación de extremos romos usando el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E.coli* (*Thermo Scientific*).

En todos ellos se utilizaron protocolos estándar ampliamente descritos (Sambrook et al., 1989).

3.3. Electroforesis.

Para la separación de bandas de ADN ya fuera para comprobaciones o para una posterior purificación de estas, se llevaron a cabo electroforesis en geles de agarosa de una concentración del 0.7%. Excepcionalmente y según el tamaño de las bandas se utilizaron porcentajes más altos. El componente líquido de los geles y el buffer para la carrera se basan en el tampón TAE1x (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7.5-7.8) y se añade Midori Green que se intercala en el ADN permitiendo la visualización posterior de las bandas.

Para la purificación de las bandas se utilizó el kit denominado *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*).

3.4. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Para la amplificación de fragmentos de ADN se llevó a cabo la reacción de PCR la cual requiere básicamente de varios componentes en la mezcla de reacción: ADN molde plasmídico o genómico, oligonucleótidos (1 μ M cada uno; Tabla5, Anexo), dNTPs (mezcla de los cuatro, 10 mM) y 2 buffers, uno que contiene esencialmente NH₄ (1x) y otro que contiene MgCl₂ (1.5 mM). La polimerasa utilizada es *BioTAQ DNA Polymerase* (*Bioline*) que se añade a una concentración de 0.25 unidades/reacción.

En un termociclador se programan las distintas etapas en las que se basa la PCR y que se detallan a continuación.

Desnaturalización inicial	5 minutos a 94°C	
1. Desnaturalización de ADN	30 segundos a 94°C	} x 30 ciclos
2. Anillamiento de oligos	45 segundos a 55°C	
3. Extensión	3.5 minutos a 68°C	
Extensión final	10 minutos a 68°C	

Si bien según la temperatura de anillamiento o de fusión/ melting (T_m) de los oligos o el tamaño final del producto que quisiéramos obtener, la temperatura de la etapa de anillamiento, así como la duración de la etapa de extensión variaban.

Para la PCR de colonia el programa incluye 35 ciclos y se parte de cultivo en agar.

4. VECTORES EMPLEADOS

4.1. Vectores de *E.coli*.

Los vectores empleados en este caso pertenecen a la serie pUC. Estos vectores se utilizaron como molde para amplificar secuencias sintéticas de interés para la construcción de determinadas quimeras con fusiones específicas de ADN. Los vectores contenían estas secuencias clonadas y eran del tipo pUC-GW-Amp o pUC-GW-kan con marcadores de resistencia a ampicilina y kanamicina respectivamente (Tabla 3, Anexo).

4.2. Vectores de *S.cerevisiae*.

La mayor parte de vectores empleados durante este trabajo pertenecen a la serie pRS310: pRS313, pRS314, pRS315 y pRS316 (Sikorski & Hieter, 1989), con marcadores seleccionables *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*, respectivamente. Estos plásmidos contienen una secuencia de replicación autónoma *ARS4* y una secuencia centromérica *CEN6*, que les confiere estabilidad mitótica y meiótica en bajo número de copias (1 a 2 por cada célula) y capacidad de replicación autónoma.

Los plásmidos de la serie pRS420 (Christianson et al., 1992) cuentan con la misma secuencia que los pRS310, conteniendo además un origen de replicación del plásmido 2μ de *S. cerevisiae*, por lo que se mantienen en alto número de copias en la levadura (entre 20 y 30 por cada célula). Los plásmidos de esta serie se han utilizado para los experimentos de sobreexpresión.

También se utilizaron plásmidos de las series pFA6a, pUG y el vector pRS303 (*HIS3*) como ADN molde para la amplificación y obtención de casetes.

De forma general, el gen indicado se expresa en todos los plásmidos a partir de su propio promotor. Solo en algunos casos se introdujo el promotor pGAL en el extremo N-terminal de la ORF de interés. Para ello se construía un casete usando como molde el plásmido pFA6a-*kanMx6-PGAL1*.

Todos los vectores utilizados a lo largo de esta tesis se recogen en la tabla 3 del anexo.

4.2.1. Construcción de plásmidos.

Muchos de los vectores construidos en este trabajo se obtuvieron por procedimientos de clonación/subclonación (Sambrook et al., 1989) a partir de plásmidos ya existentes en la colección del laboratorio. La obtención más específica del resto de plásmidos se detalla en los dos epígrafes siguientes. De forma general, todos los plásmidos construidos mediante recombinación homóloga fueron primero comprobados por digestión con determinadas endonucleasas de restricción, para después ser verificados mediante secuenciación directa.

4.2.2. Construcción de quimeras de Chs3 en plásmidos pRS315.

El proceso de diseño y generación de la mayoría de las quimeras de Chs3 se detalla en el inicio del capítulo I de Resultados (**Figura 15**) y en el anexo se especifican los oligonucleótidos y enzimas de restricción requeridos para la construcción de cada una de las quimeras. De la misma manera se construyeron los plásmidos pRS315 conteniendo las quimeras con delecciones en el dominio luminal de Chs3 marcadas con GFP en su extremo C-terminal. Si bien en este caso solo dos se construyeron a partir de fragmentos sintéticos, las quimeras Chs3^{Δ260-360} y Chs3^{Δ260-390}. La obtención del resto de quimeras del dominio luminal (Chs3^{Δ238-441}, Chs3^{Δ260-441}, Chs3^{Δ295-441} y Chs3^{Δ310-441}) se detalla en la **Figura 67**. Estas últimas se construyeron cotransformando el mutante *chs3Δ* con el vector pRS315::*Chs3*-GFP linearizado con la enzima Paul (sitio único de corte entre zonas de fusión que habíamos generado por mutagénesis dirigida) y un producto de PCR obtenido a partir de dicho vector utilizando oligos forward de 120pb que portaban las fusiones de interés (Parte 1 variable en función de cada quimera, morado; Parte 2 común para todas, naranja), y un oligo reverse anillando después del sitio de corte con el que habíamos linearizado el vector (**Figura 67A**).

Una vez producida la recombinación en la cepa de levadura, entre el producto de PCR y el vector linearizado (**Figura 67B**), se extraía el ADN genómico de esta. Ese ADN genómico luego se usaba para electroporar *E.coli* desde donde se recuperaba el correspondiente plásmido (**Figura 67C**). Por último, mediante análisis de restricción y secuenciación se comprobaba que se había obtenido la quimera deseada.

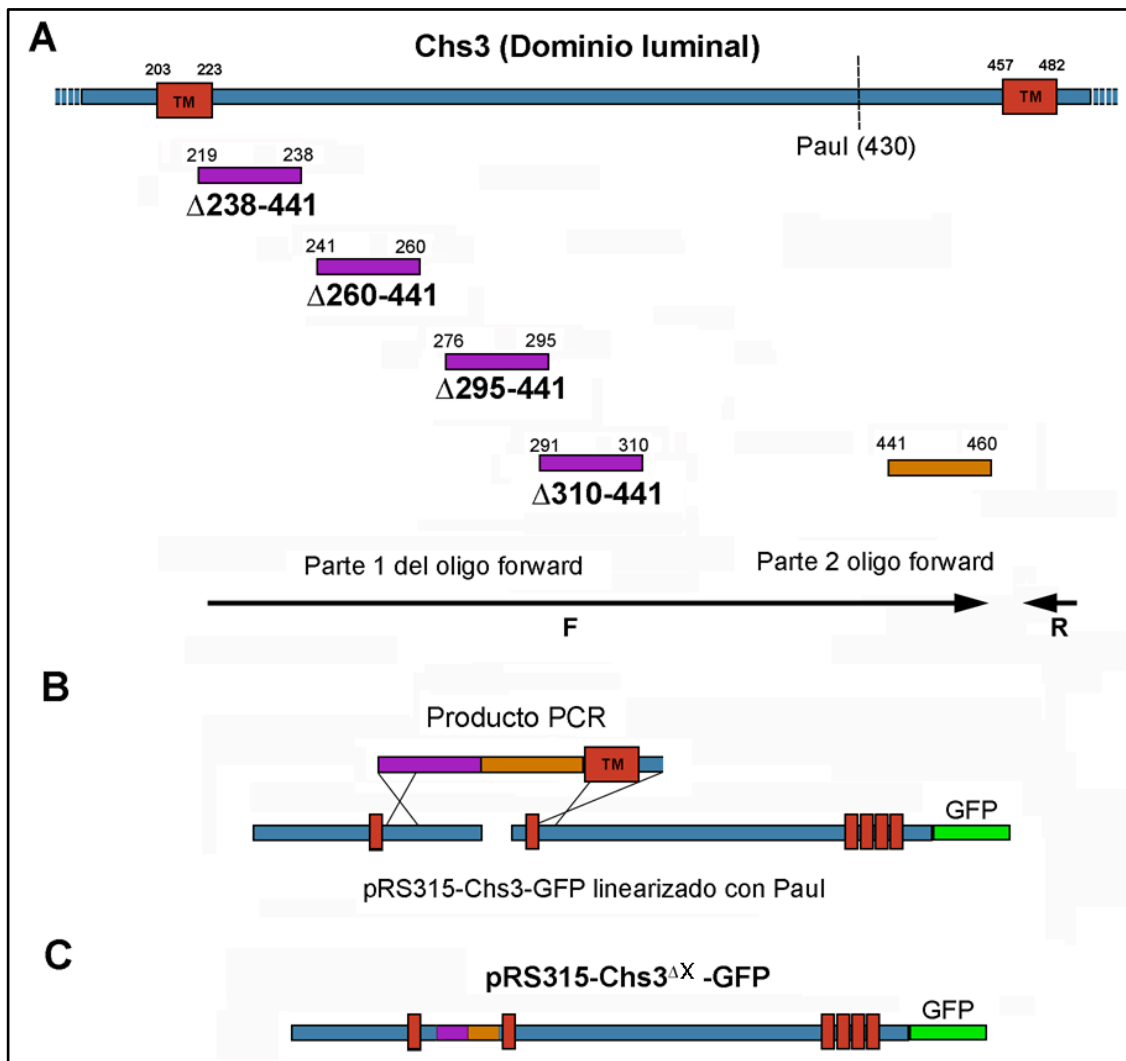


Figura 67. Esquema de construcción de las quimeras Chs3 $\Delta 238-441$, Chs3 $\Delta 260-441$, Chs3 $\Delta 295-441$ y Chs3 $\Delta 310-441$ en plásmidos pRS315. En A se indican los números de los aminoácidos dentro de la secuencia de Chs3.

Las truncaciones N y C-terminales de Chs3 con sus correspondientes epítomos habían sido descritas previamente (Sacristan et. al, 2013). La construcción del plásmido pRS315:: $\Delta 126$ Fragmento2(Chs3)-GFP se basó en la cotransformación del mutante *chs3* Δ con el plásmido pRS315:: $\Delta 126$ Chs3-GFP (Sacristan et al., 2013) linearizado con la enzima CspCI y un producto de PCR obtenido con oligos específicos que anillan en el plásmido pRS315::Fragmento2(Chs3)-GFP (este trabajo). Una vez obtenidos los correspondientes transformantes, se extraía su ADN genómico para electroporar *E.coli* con este, organismo desde donde luego se recuperaba el plásmido de interés.

4.2.3. Construcción de mutantes de N-glicosilación, ubiquitinación y palmitoilación.

Los mutantes de N-glicosilación simples, el doble y el triple de Chs3 se encontraban ya en la colección del laboratorio (Sacristan et al., 2013). El mutante de N-glicosilación del Fragmento 2 (Fr2^{N303/332/371Q}) se construyó linearizando en este caso el plásmido pRS315::Fragmento2(Chs3)-GFP (este trabajo) con BglII y cotransformando el mutante

chs3Δ con dicho plásmido linearizado y con un fragmento de PCR conteniendo la región de interés, obtenido a partir del plásmido molde pRS315::*Chs3*^{N303/332/371Q}-GFP. Una vez obtenidos los correspondientes transformantes, se extraía su ADN genómico para electroporar *E.coli*, desde donde luego se recuperaba el plásmido de interés.

El mutante de ubiquitinación pRS315:: Δ^{126} *Chs3*^{K136/492/496/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R}-GFP (Δ^{126} *Chs3*^{12K}) se obtuvo cotransformando el mutante *chs3Δ* con el plásmido pRS315 que contenía al mutante *Chs3*^{15K}-GFP linearizado y un fragmento obtenido por PCR con oligos específicos sobre el plásmido pRS315:: Δ^{126} *Chs3*-GFP. Una vez obtenidos los correspondientes transformantes, se extraía su ADN genómico para electroporar *E.coli* con este, desde donde luego se recuperaba el plásmido de interés. El plásmido pRS315::*Chs3*^{15K}-GFP fue obtenido previamente por mutagénesis dirigida (de la lisina 496 por arginina) a partir del pRS315::*Chs3*^{K118/119/123/136/492/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R}-GFP (*Chs3*^{14K}) (Arcones et al., 2016). El mutante en la señal dilisina de reconocimiento por COPI de la quimera Δ^{126} *Chs3*, Δ^{126} *Chs3*^{K1125/1126R} (Δ^{126} *Chs3*^{KK}), ya había sido descrito (Sacristan et al., 2013).

El mutante de palmitoilación *Chs3*^{C1014/1018A} se construyó por mutagénesis dirigida a partir del plásmido pRS315::*Chs3*-GFP y un oligonucleótido diseñado conteniendo dichas mutaciones.

4.2.4. Construcción de plásmidos pRS315/pRS314:: Δ^{126} *Chs3*-VenusN-terminal/VenusC-terminal::*kanMx4/HIS3*.

Para obtener los plásmidos que portaban a la quimera Δ^{126} *Chs3* marcada en su C-terminal con los fragmentos de la VENUS para los ensayos de BiFC se facilitó la recombinación mediante cotransformación de los plásmidos pRS315:: Δ^{126} *Chs3*-GFP o pRS314:: Δ^{126} *Chs3*-GFP con el correspondiente casete obtenido a partir del molde pFA6a::VN/VC::*kanMx4/HIS3* en el mutante *chs3Δ*. Posteriormente se extrajo el ADN de la levadura, se electroporó en *E.coli* y se recuperaron los plásmidos que se digirieron y secuenciaron para confirmar que efectivamente habíamos obtenido los plásmidos de interés.

5. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIONES.

5.1. Microscopía de fluorescencia.

La observación de muestras con fluorescencia se realizó rutinariamente con un microscopio *Nikon 90i* mediante la iluminación de las muestras con un sistema de epifluorescencia, empleando una lámpara de mercurio de 130 W. Se empleó el objetivo 100x con una apertura numérica (NA) de 1.45. Además, se usaron los filtros adecuados para dejar pasar la luz ultravioleta (UV) de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos utilizados: 49000 ET-DAPI, 49002 ET-GFP (FITC/Cy2), 49003 ET-YFP y 49005 ET-DsRed (TRITC/Cy3) (*Chroma Technology Corp*). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital Hamamatsu ORCA ER y el programa informático Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) asociado a ella. Las

observaciones se realizaron sobre preparaciones húmedas a partir de cultivos en medio líquido y la adquisición se realizó bajo condiciones idénticas para cada serie.

Fluorescencia directa con proteínas de fusión.

En este trabajo se han utilizado fundamentalmente las proteínas verdes fluorescentes GFP y su variante SuperfolderGFP. Estas se excitaron con el filtro 49002 ET-GFP. Las proteínas rojas fluorescentes mCherry, mRFP y mRuby2 se excitaron con el filtro 49005 ET-DsRed. Para visualizar estas proteínas fluorescentes es necesario haber fusionado previamente la secuencia de ADN que codifica nuestra proteína en fase con la del fluoróforo. La tinción con CW se observaba utilizando el filtro 49000 ET-DAPI.

BiFC (Bi-molecular Fluorescence Complementation).

La complementación fluorescente bimolecular se basa en la reconstrucción de una proteína fluorescente que actúa como testigo. Para ello, se marcan dos proteínas distintas, candidatas a interactuar, con mitades complementarias de la proteína fluorescente, de modo que solo la interacción de las primeras reconstruye la proteína fluorescente de modo funcional. Este hecho se evidencia mediante una señal fluorescente. La complementación es irreversible y, por lo tanto, refleja la asociación de las proteínas diana en el momento de la formación del complejo. En este trabajo se utilizaron los fragmentos N-terminal (VN) y C-terminal (VC) de la proteína fluorescente VENUS para llevar a cabo este tipo de análisis. La visualización se produjo en el canal de la YFP (49003 ET-YFP) ya que la proteína VENUS es una variante de esta (λ^A/λ^E , 515/528 nm).

Las células expresando todos estos marcadores fluorescentes se crecieron en el medio SD específico en cada caso, suplementado con adenina al 0.2% para suprimir la autofluorescencia celular. La visualización se realizó siempre en células en fase exponencial de crecimiento.

5.2. Microscopía confocal.

Para algunos experimentos de colocalización y de complementación BiFC se utilizó el microscopio confocal Spinning disk OLYMPUS IX 81, equipado con una cabeza confocal CSUX1-A1 (*Yokogawa*), un objetivo Plan Apo 100x/1.4 y una cámara de adquisición EVOLVE de *Photometrics*. Para la fluorescencia se empleó el módulo de línea láser iLas (*ROPER Scientific*). En estos experimentos se tomaron imágenes procedentes de la excitación de los fluorocromos GFP, YFP y mCherry/mRuby2/mRFP.

6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

6.1. Tratamientos previos a la extracción de proteínas.

La mayoría de los experimentos realizados no requerían de tratamientos previos, recogiendo simplemente la muestra en fase logarítmica y procediendo directamente a la extracción (siguiente punto). Sin embargo, determinados experimentos requerían pasos previos basados fundamentalmente en el tratamiento con determinados compuestos. A continuación, se explica cómo se procedió en estos experimentos:

- Los ensayos de inhibición del proteasoma se llevaron a cabo utilizando un protocolo adaptado al de Liu et al. (2007). En primer lugar, se ponía el día antes un preinóculo de los cultivos en el medio SD correspondiente. Al día siguiente se refrescaba el preinóculo en nuevo medio y se añadía SDS al 0.003% para permeabilizar las células, que se incubaban a 28°C hasta alcanzar la fase logarítmica. En ese momento una parte del cultivo se trataba con DMSO (control, *Sigma*) y la otra parte con el inhibidor del proteasoma MG-132 (*Sigma*, a una concentración final de 75 µM). Tras la media hora de incubación con estos compuestos se inhibía la síntesis de proteínas usando cicloheximida a 100 µg/ml volviéndose a incubar a 28°C y recogiendo muestra por centrifugación a distintos tiempos. Posteriormente se llevaba a cabo la extracción de proteínas de la forma descrita en el punto 6.2.

- Para las cinéticas con cicloheximida se trataban las células, una vez en fase logarítmica, con cicloheximida a una concentración de 100 µg/ml y se volvía a incubar recogiendo muestra a distintos tiempos. Estos experimentos se realizaron a 28°C excepto en el caso de los mutantes termosensibles donde las células se crecían a 25°C, se tomaba la primera muestra a esa temperatura (tiempo 0), y después se añadía la cicloheximida y se incubaba el cultivo a 37°C tomando muestra a distintos tiempos tras el choque térmico.

6.2. Obtención de extractos de proteínas.

A lo largo del trabajo se ha utilizado de forma rutinaria el protocolo basado en la precipitación con ácido tricloroacético (TCA) para los experimentos de Western Blot. Para obtener los extractos se recogían de 10-20 ml de cultivo líquido en fase logarítmica (DO= 0.7-1). Las células se centrifugaban y lavaban con TCA al 20% para posteriormente resuspenderse en 50 µl de este. Se añadían bolas de vidrio para proceder a su rotura mecánica en un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101 (Savant)* en tres intervalos de 30 segundos a una intensidad de 5.5-6.0. A los tubos con el lisado se les añadían 400 µl de TCA al 5%, se agitaban en vortex y posteriormente se perforaban colocándose estos sobre nuevos tubos eppendorf para eliminar las bolas de vidrio y otros restos. Se centrifugaba durante 1 minuto a 2000 rpm y, una vez bajado, el lisado se volvía a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm. Se eliminaba el sobrenadante resuspendiendo el pellet en unos 100 µl de una mezcla formada por 50 µl de agua, 20 µl de SDS 10% y 30 µl de Tris base 1M. Se hervía la muestra a 95°C durante 5 minutos, salvo en el caso de los extractos de Chs7 en los que la muestra se incubaba a 37°C. Finalmente, los extractos se centrifugaban a alta velocidad durante 2 minutos y se recogía el sobrenadante. La concentración de proteína de cada extracto se cuantificaba por el método de Bradford (1976) y se añadía buffer de carga 2x con DTT (Tris-

HCl 100 mM pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, DTT 25 mM y trazas de azul de bromofenol). Todo el protocolo descrito se llevaba a cabo a 4°C para prevenir al máximo la degradación de las proteínas. Para la realización del SDS-PAGE e inmunodetección se cargaban típicamente 50 o 100 µg de proteína total.

6.3. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección.

Las proteínas, una vez extraídas, se resolvían por electroforesis en geles de poliacrilamida (*BioRad*) en condiciones desnaturizantes (1% SDS) a 150mV durante aproximadamente 1.5 horas, según la técnica descrita por Laemmli (1970). La concentración de los geles de poliacrilamida usada variaba en función de la proteína a separar (6.5 a 15%). La composición del tampón de carrera es: Tris base 6 g/l, SDS 2 g/l y glicina 28 g/l. La transferencia de las proteínas a membranas de PVDF (*ImmobilonTM-P, Millipore*) se realizó mediante el sistema "Mini-Trans-Blot" (*BioRad*) durante 1 hora a 400 mA, usando como tampón de transferencia Tris-Glicina (Tris base 3 g/l y glicina 14.4 g/l).

Con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo, se procedía al bloqueo de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo empleada era leche en polvo desnatada disuelta en TBST al 3% (Tris base 2.5 g/l, NaCl 9 g/l y 0.3% de Tween 20 (*Sigma*)). Después las membranas se incubaban con el correspondiente anticuerpo primario (preparado en la misma solución de bloqueo) durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo las membranas se lavaban tres veces (3 x 10 minutos) con TBST y se incubaban después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa de rábano (HRP="Horseradish Peroxidase") durante 1 hora. Tras esta incubación se volvía a lavar la membrana tres veces con TBST y se añadía el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Para esto se empleaba el "kit" *ECL* de *Advansta*.

Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron y visualizaron en un equipo *FUSION FX* (*Vilver*).

Los anticuerpos primarios utilizados para este trabajo fueron:

- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP JL-8 (*Living Colors, Clontech*). Dilución 1:1000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA 12CA5 (*Roche*). Dilución 1:5000.
- Anticuerpo monoclonal anti-tubulina T5162 (*Sigma*). Dilución 1:5000.
- Anticuerpo monoclonal anti-actina JLA20 (*Sigma*). Dilución 1:2500.

En cuanto a los anticuerpos secundarios se usó un anticuerpo policlonal anti-Ig de ratón unido a peroxidasa de rábano (*BioRad*) a una dilución de 1:10000.

6.4. Blue Native Page (BN-Page).

En estos experimentos se recogían 50 ml de cultivo en fase logarítmica por centrifugación. Posteriormente se lavaban las células en un buffer de lisis (50 mM Tris-HCl 1M pH 7.5, 5 mM de EDTA 0.5 M pH 8, inhibidores de proteasas: 1 µg/ml aprotinina, 1 µg/ml leupeptina y 2 mM PMSF) en el que después se resuspendían para su ruptura con bolas de vidrio. Una vez hecho esto, se procedía a remover los restos celulares y las bolas de vidrio por centrifugación (1 minuto a 2000 rpm, 4°C). Se recogía el sobrenadante y se centrifugaba este a x21000g durante 30 minutos (centrifugación diferencial de la fracción reticular). Se eliminaba el sobrenadante y se resuspendía el pellet (conteniendo las membranas) en 100 µl de glicerol al 15%. Se medía la concentración de proteínas por Bradford y ajustábamos la concentración de nuestras proteínas en las muestras a aproximadamente 5 µg/µl en 100 µl finales diluyendo estas en el buffer de lisis o en el glicerol.

Una vez recogidas las muestras, se procedía al tratamiento de los extractos con los detergentes digitonina (0.5-1%) o SDS (1%, Control). Para esto, 10 µl de estos extractos se combinaban con el detergente en una mezcla de 50 µl que además contenía buffer SB4x y a la que se añadía azul de Coomassie (G-250). Una vez preparadas las mezclas anteriores, las muestras con digitonina se resuspendían suavemente y se incubaban durante 30 minutos a 4°C o a temperatura ambiente en el caso de las muestras con SDS. Por último, todas las muestras se centrifugaban a x15000g durante 5 minutos para eliminar las membranas no solubilizadas y se recogía el sobrenadante que es el que cargábamos en la electroforesis.

El protocolo de electroforesis en condiciones nativas utilizado fue el descrito por *Invitrogen* con algunas variaciones. En nuestro caso usamos geles ya preparados al 4-12% (*Invitrogen*). La carrera se realizaba utilizando un buffer para el ánodo (950 ml agua miliQ + 50 ml Native Page Running Buffer 20x de *Invitrogen*) y otro para el cátodo (denominado Light Blue: 10 ml de Native Page Running Buffer 20x, 1 ml de Native Page Chatode Additive 20x de *Invitrogen* y agua miliQ hasta completar 200 ml). Una vez colocados los buffers en la cubeta, se procedía a cargar las muestras y se seguía el protocolo de inmunodetección ya descrito con ligeras variaciones. Dichas variaciones se basaban en las condiciones del proceso de transferencia que en este caso se realizaba a 60V durante 1-2 horas y en el posterior incubado de las membranas durante 15 minutos en acético al 8%. Una vez tratadas con acético, las membranas se lavaban con agua y se dejaban secar al aire para luego rehidratarse con metanol (*Merck*) y así conseguir quitar todo el colorante azul antes de proseguir con el proceso de bloqueo.

6.5. Ensayos de cross-linking.

Para ver la agregación de proteínas se realizaron ensayos de cross-linking con el compuesto DSP (*Sigma*), de acuerdo con los experimentos descritos por Kota & Ljungdahl (2005). De esta manera se recogían por centrifugación entre 30-50 ml de cada cultivo en fase logarítmica. Posteriormente se lavaban las células en agua fría y se resuspendían en 200 µl de PBS a pH 7.4. Después de la ruptura de las células con bolas de vidrio y de remover los restos celulares y las bolas de vidrio por centrifugación (5 minutos a 13000 rpm, 4°C), 10 µg de proteína eran tratados con el crosslinker DSP a concentraciones en el rango de 0.05-0.1 mM durante 30 minutos a 22°C. Posteriormente las muestras se trataban con 30 mM de Tris-HCl pH 7.5 durante 30 minutos a 22°C para neutralizar los grupos reactivos libres.

Adicionalmente, las muestras control se trataban con 40 mM de DTT durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, todas las muestras se hervían durante 5 minutos con el buffer de carga preparado con β -mercaptoetanol. Se cargaban 10 μ g de proteína en un gel de acrilamida a un porcentaje del 6.5%.

7. ANÁLISIS PARA MEDIR ESTABILIDAD Y ABUNDANCIA DE PROTEÍNAS.

7.1. Búsqueda masiva de dianas implicadas en la degradación de nuestras proteínas.

Construcción de cepas para la búsqueda masiva.

Las cepas “*queries*” para realizar la búsqueda masiva o *screening* (fondo genético Y8205) tuvieron que marcarse previamente en el genoma en el extremo C-terminal de la proteína/quimera de interés con el tándem mCherry-SuperfolderGFP también denominado *timer* fluorescente en tándem (tFT= “tandem fluorescent timer”). Para realizar esto se llevaron a cabo 2 aproximaciones:

1. En el caso de proteínas ya presentes en el genoma simplemente llevamos a cabo la técnica de reemplazamiento génico transformando la correspondiente levadura con un casete obtenido a partir del plásmido molde pFA6a-mCherry-SuperfolderGFP::*hphNT1* y oligos específicos. Este plásmido se obtuvo mediante una subclonación simple a partir de los plásmidos pFA6a-mCherry-SuperfolderGFP::*kanMx4* y pFA6a::*hphNT1*. La construcción previa de este plásmido resultó imprescindible ya que para la búsqueda masiva era necesario cruzar nuestra cepa marcada con librerías de delección del tipo *orfΔ*::*kanMx* y, por lo tanto, se precisaba de un marcador de selección distinto.
2. En el caso de las quimeras de Chs3 que se encontraban en plásmidos pRS315 marcadas con GFP lo que se hizo fue obtener primero el plásmido del tipo pRS315-QuimeraX-mCherry-SuperfolderGFP::*hphNT1* mediante un proceso de reemplazamiento génico (**Figura 68**). Para ello se realizó la cotransformación del mutante *chs3Δ* con el plásmido conteniendo la quimera linearizado con NcoI (sitio único de corte) (**Figura 68B**) y un casete obtenido como producto de una PCR sobre el molde pFA6a-mCherry-SuperfolderGFP::*hphNT1* con oligos específicos (**Figura 68A**). Esta transformación se realizó en un fondo genético *chs3Δ* para evitar la recombinación con el ADN genómico de la levadura.

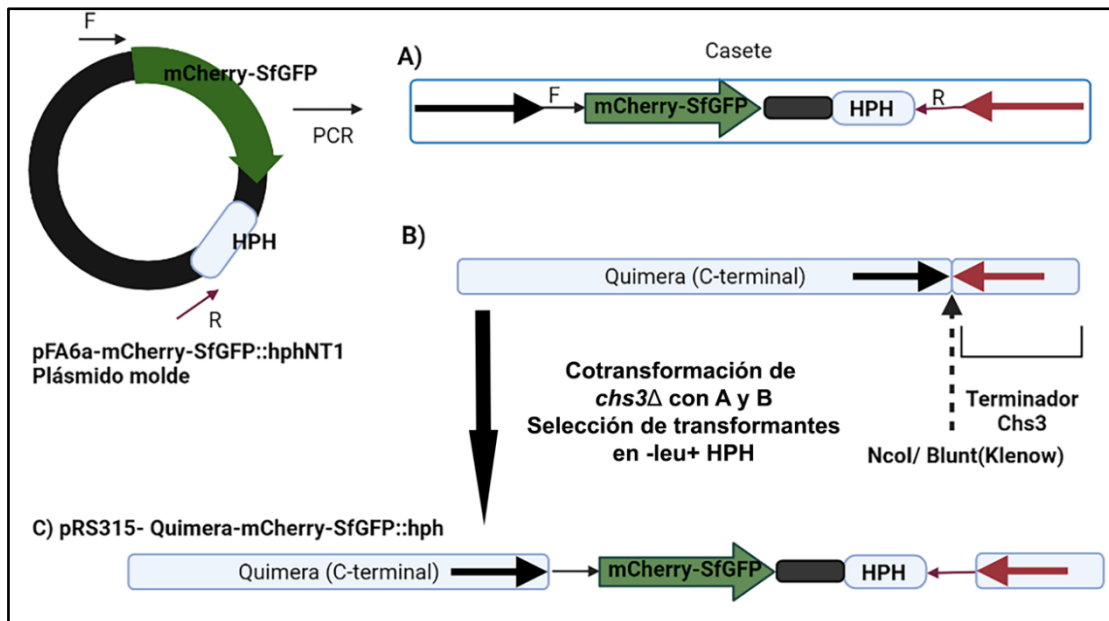


Figura 68. Esquema de construcción de plásmidos con estructura pRS315-QuimeraX-mCherry-SfGFP::hphNT1. Ver texto para explicación detallada.

Una vez obtenidos dichos plásmidos conteniendo la quimera, el tándem y el marcador de resistencia a higromicina (**Figura 68C**), estos se digirieron con 2 enzimas con sitio de corte único, una que cortaba en el promotor (NotI) y la otra en el terminador de Chs3 (AfeI), y se transformó con el ADN obtenido (banda correspondiente purificada) en este caso la levadura WT para que se produjese la recombinación a través de esas regiones y así tuviese lugar el reemplazamiento génico que nos permitiese obtener las correspondientes cepas para la búsqueda masiva (**Figura 69**).

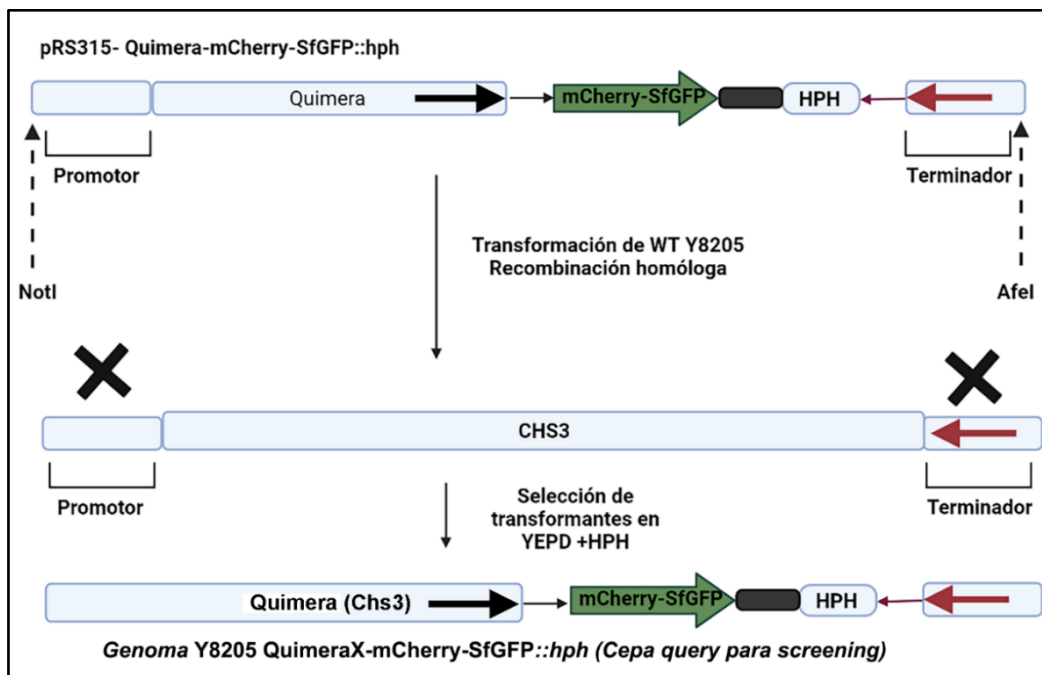


Figura 69. Esquema de construcción de cepas Y8205 con las correspondientes quimeras marcadas en el genoma con el tándem fluorescente mCherry-SfGFP::hphNT1.

Procedimiento para la realización de las búsquedas masivas o *screenings*. Metodología SGA (Synthetic Genetic Array).

Cada una de las cepas marcadas en el genoma con el tándem fluorescente era cruzada con el array/librería de mutantes de la UPS o con el array completo de mutantes de delección de *S.cerevisiae* (laboratorio de Anton Khmelinskii) usando la metodología SGA (Synthetic Genetic Array; Baryshnikova et al., 2010b; Tong et al., 2001). En un primer momento tanto la librería como nuestras cepas *queries* se condensaban (por separado) hasta un formato de 1536 colonias en el medio sólido correspondiente de acuerdo con los marcadores que presentaba cada cepa. Este medio era YEPD suplementado con higromicina en el caso de las cepas *queries* e YEPD suplementado con geneticina (G418) en el caso de las librerías. A partir de ese momento se aplicaba la metodología SGA (**Figura 70**) que implica los siguientes pasos, recogidos en la figura:

1. Conjugación (Mating).
2. Selección de diploides.
3. Esporulación.
4. Selección de haploides.

Los medios utilizados en cada paso fueron: a) En la conjugación se utilizó medio rico YEPD. b) La selección de diploides se realizó en YEPD suplementado con higromicina y geneticina para así permitir el crecimiento de los diploides que contenían la proteína con el tándem (marcador de resistencia a higromicina) y la delección correspondiente al gen de la librería en cada caso (marcador de resistencia a geneticina/G418). c) La esporulación se realizó en acetato de potasio. d) La selección de haploides se llevó a cabo en varios pasos sucesivos que tenían como base medio mínimo SD-Leu/Arg/Lys suplementado con MSG (Glutamato monosódico) y las drogas tialisina (análogo de lisina) y canavanina, de manera que en cada paso de esta selección se le iba añadiendo una droga a este medio base para ir sucesivamente seleccionando los mutantes que portaban los marcadores de interés. Así en el paso final el medio era SD-Leu/Arg/Lys suplementado con MSG (Glutamato monosódico) y las drogas tialisina, canavanina, higromicina y geneticina. En el caso en el que nuestra *query* tuviese un marcador más como era el caso del mutante *chs3Δ::NAT* (Chs7-tFT) tanto en el paso de selección de diploides como en el de haploides tenía que añadirse también la droga nourseotricina a estos medios.

Todos estos pasos se llevaron a cabo por *pinning* secuencial de colonias de la levadura en el medio selectivo apropiado para cada paso usando un robot de *pinning* (RoToR, *Singer Instruments*). El proceso de *pinning* se puede definir como la transferencia de un cultivo (que se puede encontrar o bien en medio sólido o líquido) de un medio a otro. Entre cada paso se incubaban las cepas de 1 a 2 días a 30°C o a 23°C en el caso de la existencia de mutantes termosensibles con la excepción del paso de esporulación, que conllevaba una incubación de mínimo 5 días y siempre a 23°C.

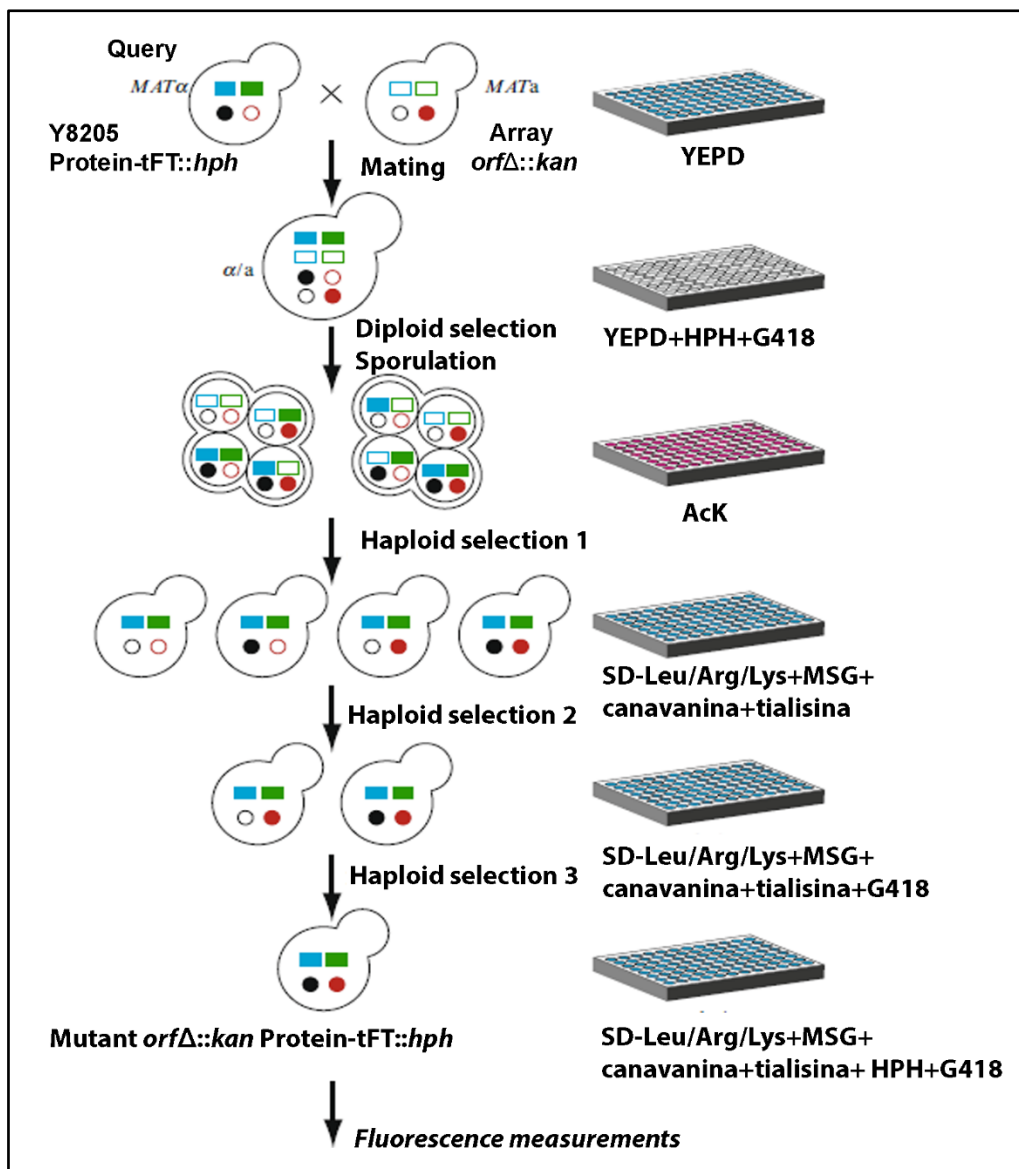


Figura 70. Figura donde se esquematiza la metodología SGA. Adaptado de (Baryshnikova et al., 2010). Los rectángulos y círculos de colores son distintos marcadores de selección que permiten la selección de los mutantes de interés en cada paso.

Las placas obtenidas tras el último paso de selección haploide fueron fotografiadas para determinar el tamaño de las colonias y posteriormente hacer las correspondientes correcciones espaciales y descartar las colonias demasiado pequeñas. Las intensidades de fluorescencia fueron medidas en una nueva tanda de placas con el mismo medio que el medio final de selección haploide y una suplementación con adenina (200 mg/l), de manera que tras la selección de haploides se llevaba a cabo un nuevo proceso de *pinning* sobre estas placas. Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizaron en un lector de fluorescencia *Infinite M1000* (Tecan) después de 24 horas de crecimiento a 30°C, o bien en el caso de haber mutantes termosensibles (como en la librería de mutantes de la UPS) se hacía una réplica y se medía una placa a 23°C y la otra a 30°C para ver las diferencias entre ambas temperaturas. Además, en este caso repetimos las medidas a 23°C, a 24 y 48 horas. Las medidas en los canales de mCherry (586/10 nm excitación, 612/10 nm emisión; ganancia óptima del detector)

y SfGFP (488/10 nm excitación, 510/10 nm emisión; ganancia óptima del detector) se llevaron a cabo a una frecuencia de 400Hz de la lámpara con 10 flases de media para cada medición.

Por último, las medidas de intensidad de fluorescencia fueron transformadas logarítmicamente. Para cada proteína marcada con el tándem, los cambios en la abundancia (intensidad de SfGFP) y la estabilidad (ratio de intensidades de mCherry/ SfGFP) fueron estimados calculando z-scores (Dederer et al., 2019). Los p-valores fueron computados usando un t-test. El procesamiento y análisis inicial de los datos lo llevó a cabo el laboratorio del Dr. Khmelinskii (IMB, Mainz). El análisis posterior y filtrado de los resultados lo realizamos nosotros utilizando Microsoft Excel.

8. ANÁLISIS DE DATOS.

El procesamiento de las imágenes obtenidas por microscopía se llevó a cabo usando los programas ImageJ (NIH), Adobe Photoshop CS5 (San José, CA, USA) y Adobe Photoshop 2021. Para la cuantificación de los Western Blots se usó la herramienta *Analyze Gels* de ImageJ y el programa Microsoft Excel para los cálculos posteriores. El filtrado de los resultados de la búsqueda masiva se realizó con Microsoft Excel. Tanto Microsoft Excel como GraphPad Prism 8 se utilizaron para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos cuando así fue necesario.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrami L, Kunz B, Iacovache I, Van Der Goot FG. 2008. Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 5384–5389.
- Allam AH, Charnley M, Russell SM. 2018. Context-Specific Mechanisms of Cell Polarity Regulation. *J. Mol. Biol.* 430: 3457–3471.
- Anand VC, Daboussi L, Lorenz TC, Payne GS. 2009. Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Mol. Biol. Cell* 20: 1592–1604.
- Annaert W, Kaether C. 2020. Bring it back, bring it back, don't take it away from me – the sorting receptor RER1. *J. Cell Sci.* 133.
- Anton-Plagaro C, Sanchez N, Valle R, Mulet JM, Duncan MC, Roncero C. 2021. Exomer complex regulates protein traffic at the TGN through differential interactions with cargos and clathrin adaptor complexes. *FASEB J.* 35.
- Arcones I, Sacristán C, 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.
- Aridor M, Hannan LA. 2002. Traffic jams II: an update of diseases of intracellular transport. *Traffic* 3: 781–790.
- Aviram S, Kornitzer D. 2010. The ubiquitin ligase Hul5 promotes proteasomal processivity. *Mol. Cell. Biol.* 30: 985–994.
- Balderhaar HJ klein., Ungermann C. 2013. CORVET and HOPS tethering complexes – coordinators of endosome and lysosome fusion. *J. Cell Sci.* 126: 1307–1316.
- Barlowe C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 13: 295–300.
- Barlowe C, Helenius A. 2016. Cargo Capture and Bulk Flow in the Early Secretory Pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32: 197–222.
- Barlowe CK, Miller EA. 2013. Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics* 193: 383–410.
- Baryshnikova A, Costanzo M, Dixon S, Vizeacoumar FJ, Myers CL, Andrews B, Boone C. 2010. Synthetic genetic array (SGA) analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 470: 145–179.
- Berner N, Reutter KR, Wolf DH. 2018. Protein Quality Control of the Endoplasmic Reticulum and Ubiquitin-Proteasome-Triggered Degradation of Aberrant Proteins: Yeast Pioneers the Path. *Annu. Rev. Biochem.* 87: 751–782.
- Bi E, Park HO. 2012. Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* 191: 347–387.
- Bianchi F, van't Klooster JS, Ruiz SJ, Poolman B. 2019. Regulation of Amino Acid Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 83.
- Boban M, Pantazopoulou M, Schick A, Ljungdahl PO, Foisner R. 2014. A nuclear ubiquitin-proteasome pathway targets the inner nuclear membrane protein Asi2 for degradation. *J. Cell Sci.* 127: 3603–3613.
- Boehm M, Bonifacino JS. 2001. Adaptins: the final recount. *Mol. Biol. Cell* 12: 2907–2920.
- Bonifacino JS. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 23–32.
- Bonifacino JS, Glick BS. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153–166.
- Botstein D, Chervitz SA, Cherry JM. 1997. Yeast as a Model Organism. *Science* 277: 1259.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254.

- Budnik A, Stephens DJ. 2009. ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett.* 583: 3796–3803.
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S. 2007. Coats, Tethers, Rabs, and SNAREs Work Together to Mediate the Intracellular Destination of a Transport Vesicle. *Dev. Cell* 12: 671–682.
- Caldwell SR, Hill KJ, Cooper AA. 2001. Degradation of endoplasmic reticulum (ER) quality control substrates requires transport between the ER and Golgi. *J. Biol. Chem.* 276: 23296–23303.
- Canagarajah BJ, Ren X, Bonifacino JS, Hurley JH. 2013. The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery. *Protein Sci.* 22: 517–529.
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA. 2006. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126: 361–373.
- Chaari A. 2019. Molecular chaperones biochemistry and role in neurodegenerative diseases. *Int. J. Biol. Macromol.* 131.
- Cheng HR, Jiang N. 2006. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnol. Lett.* 28: 55–59.
- Chidambaram S, Zimmermann J, von Mollard GF. 2008. ENTH domain proteins are cargo adaptors for multiple SNARE proteins at the TGN endosome. *J. Cell Sci.* 121: 329–338.
- Chino H, Mizushima N. 2020. ER-Phagy: Quality Control and Turnover of Endoplasmic Reticulum. *Trends Cell Biol.* 30: 384–398.
- Christianson TW, Sikorski RS, Dante M, Shero JH, Hieter P. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110: 119–122.
- Cohen M, Stutz F, Dargemont C. 2003. Deubiquitination, a New Player in Golgi to Endoplasmic Reticulum Retrograde Transport. *J. Biol. Chem.* 278: 51989–51992.
- Conibear E, Stevens TH. 1998. Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1404: 211–230.
- Čopič A, Starr TL, Schekman R. 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.
- Cos T, Ford RA, Trilla JA, Duran A, Cabib E, Roncero C. 1998. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* 256: 419–426.
- Cowles CR, Odorizzi G, Payne GS, Emr SD. 1997. The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* 91: 109–118.
- Cui Y, Parashar S, Zahoor M, Needham PG, Mari M, Zhu M, Chen S, Ho HC, Reggiori F, Farhan H, Brodsky JL, Ferro-Novick S. 2019. A COPII subunit acts with an autophagy receptor to target endoplasmic reticulum for degradation. *Science (80-.).* 364: 53–60.
- Daboussi L, Costaguta G, Payne GS. 2012. Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* 14: 239–248.
- Dancourt J, Barlowe C. 2010. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 777–802.
- Day KJ, Casler JC, Glick BS. 2018. Budding Yeast Has a Minimal Endomembrane System. *Dev. Cell* 44: 56-72.e4.
- De Craene JO, Ripp R, Lecompte O, Thompson JD, Poch O, Friant S. 2012. Evolutionary analysis of the ENTH/ANTH/VHS protein superfamily reveals a coevolution between membrane trafficking and metabolism. *BMC Genomics* 13.
- De Matteis MA, Luini A. 2008. Exiting the Golgi complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 273–284.
- De M, Abazeed ME, Fuller RS. 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.

- Dederer V, Khmelinskii A, Huhn AG, Okreglak V, Knop M, Lemberg MK. 2019. Cooperation of mitochondrial and er factors in quality control of tail-anchored proteins. *Elife* 8.
- Dharwada ST, Dalton LE, Bean BDM, Padmanabhan N, Choi C, Schluter C, Davey M, Conibear E. 2018. The chaperone Chs7 forms a stable complex with Chs3 and promotes its activity at the cell surface. *Traffic* 19: 285–295.
- Dikic I. 2017. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. *Annu. Rev. Biochem.* 86: 193–224.
- Duncan MC, Payne GS. 2003. ENTH/ANTH domains expand to the Golgi. *Trends Cell Biol.* 13: 211–215.
- Erapapazoglou Z, Froissard M, Nondier I, Lesuisse E, Haguenaer-Tsapis R, Belgareh-Touzé N. 2008. Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic* 9: 1372–1391.
- Fang NN, Zhu M, Rose A, Wu K-P, Mayor T. 2016. Deubiquitinase activity is required for the proteasomal degradation of misfolded cytosolic proteins upon heat-stress. *Nat. Commun.* 7: 12907.
- Farré JC, Subramani S. 2016. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 537–552.
- Feyder S, De Craene J-O, Bär S, Bertazzi DL, Friant S. 2015. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 1509–1525.
- Finley D, Ulrich HD, Sommer T, Kaiser P. 2012. The ubiquitin-proteasome system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192: 319–360.
- Foresti O, Rodriguez-Vaello V, Funaya C, Carvalho P. 2014. Quality control of inner nuclear membrane proteins by the Asi complex. *Science* 346: 751–755.
- Forsberg H, Hammar M, Andréasson C, Molinér A, Ljungdahl PO. 2001. Suppressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 158: 973–988.
- Franić D, Zubčić K, Boban M. 2021. Nuclear Ubiquitin-Proteasome Pathways in Proteostasis Maintenance. *Biomolecules* 11: 1–16.
- Fregno I, Fasana E, Bergmann TJ, Raimondi A, Loi M, Soldà T, Galli C, D'Antuono R, Morone D, Danieli A, Paganetti P, Anken E, Molinari M. 2018. ER-to-lysosome-associated degradation of proteasome-resistant ATZ polymers occurs via receptor-mediated vesicular transport. *EMBO J.* 37.
- Fregno I, Molinari M. 2019. Proteasomal and lysosomal clearance of faulty secretory proteins: ER-associated degradation (ERAD) and ER-to-lysosome-associated degradation (ERLAD) pathways. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 54: 153–163.
- Gauss R, Kanehara K, Carvalho P, Ng DTW, Aebi M. 2011. A complex of Pdi1p and the mannosidase Htm1p initiates clearance of unfolded glycoproteins from the endoplasmic reticulum. *Mol. Cell* 42: 782–793.
- Gelling CL, Dawes IW, Perlmutter DH, Fisher EA, Brodsky JL. 2012. The endosomal protein-sorting receptor sortilin has a role in trafficking α -1 antitrypsin. *Genetics* 192: 889–903.
- Geva Y, Schuldiner M. 2014. The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr. Biol.* 24.
- Ghaemmaghami S, Huh WK, Bower K, Howson RW, Belle A, Dephoure N, O'Shea EK, Weissman JS. 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425: 737–741.
- Gillingham AK, Munro S. 2016. Finding the Golgi: Golgin Coiled-Coil Proteins Show the Way. *Trends Cell Biol.* 26: 399–408.

- Glover JR, Lindquist S. 1998. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: A Novel Chaperone System that Rescues Previously Aggregated Proteins. *Cell* 94: 73–82.
- Goldstein AL, McCusker JH. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15: 1541–1553.
- Goode BL, Eskin JA, Wendland B. 2015. Actin and endocytosis in budding yeast. *Genetics* 199: 315–358.
- Guerriero CJ, Brodsky JL. 2012. The delicate balance between secreted protein folding and endoplasmic reticulum-associated degradation in human physiology. *Physiol. Rev.* 92: 537–576.
- Habeck G, Ebner FA, Shimada-Kreft H, Kreft SG. 2015. The yeast ERAD-C ubiquitin ligase Doa10 recognizes an intramembrane degron. *J. Cell Biol.* 209: 261–273.
- Hammer JA 3rd, Sellers JR. 2011. Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13: 13–26.
- Hanley SE, Cooper KF. 2020. Sorting Nexins in Protein Homeostasis. *Cells* 10: 17.
- Hebert DN, Molinari M. 2007. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiol. Rev.* 87: 1377–1408.
- Hecht KA, O'Donnell AF, Brodsky JL. 2014. The proteolytic landscape of the yeast vacuole. *Cell. Logist.* 4: e28023.
- Herzig Y, Sharpe HJ, Elbaz Y, Munro S, Schuldiner M. 2012. A systematic approach to pair secretory cargo receptors with their cargo suggests a mechanism for cargo selection by Erv14. *PLoS Biol.* 10: e1001329.
- Hierro A, Gershlick DC, Rojas AL, Bonifacino JS. 2015. Formation of Tubulovesicular Carriers from Endosomes and Their Fusion to the trans-Golgi Network. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 318: 159–202.
- Holmberg CI, Staniszewski KE, Mensah KN, Matouschek A, Morimoto RI. 2004. Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. *EMBO J.* 23: 4307–4318.
- Hong E, Davidson AR, Kaiser CA. 1996. A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole. *J. Cell Biol.* 135: 623–633.
- Hung CW, Duncan MC. 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, Spang A. 2016. Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep.* 17: 202–219.
- Jaenicke LA, Brendebach H, Selbach M, Hirsch C. 2011. Yos9p assists in the degradation of certain nonglycosylated proteins from the endoplasmic reticulum. *Mol. Biol. Cell* 22: 2937–2945.
- Kahlhofer J, Leon S, Teis D, Schmidt O. 2021. The α -arrestin family of ubiquitin ligase adaptors links metabolism with selective endocytosis. *Biol. cell* 113: 183–219.
- Keiser KJ, Barlowe C. 2020. Molecular dissection of the Erv41-Erv46 retrograde receptor reveals a conserved cysteine-rich region in Erv46 required for retrieval activity. *Mol. Biol. Cell* 31: 209–220.
- Khmelniskii, Anton and Knop M. 2014. Chapter 13: Analysis of Protein Dynamics with Tandem Fluorescent Protein Timers. *Exocytosis Endocytosis - Methods* 1174: 171–182.
- Khmelniskii A, Blaszczyk E, Pantazopoulou M, Fischer B, Omnis DJ, Dez G Le, Brossard A, Gunnarsson A, Barry JD, Meurer M, Kirrmaier D, Boone C, Huber W, Rabut G, Ljungdahl PO, Knop M. 2014. Protein quality control at the inner nuclear membrane. *Nature* 516: 410–413.

- Khmelinskii A, Keller PJ, Bartosik A, Meurer M, Barry JD, Mardin BR, Kaufmann A, Trautmann S, Wachsmuth M, Pereira G, Huber W, Schiebel E, Knop M. 2012. Tandem fluorescent protein timers for in vivo analysis of protein dynamics. *Nat. Biotechnol.* 30: 708–714.
- Kincaid MM, Cooper AA. 2007. Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals. *Mol. Biol. Cell* 18: 455–463.
- Koch BA, Jin H, Tomko RJ, Yu HG. 2019. The anaphase-promoting complex regulates the degradation of the inner nuclear membrane protein Mps3. *J. Cell Biol.* 218: 839–854.
- Kong KYE, Fischer B, Meurer M, Kats I, Li Z, Rühle F, Barry JD, Kirrmaier D, Chevyreva V, San Luis BJ, Costanzo M, Huber W, Andrews BJ, Boone C, Knop M, Khmelinskii A. 2021. Timer-based proteomic profiling of the ubiquitin-proteasome system reveals a substrate receptor of the GID ubiquitin ligase. *Mol. Cell* 81: 2460-2476.
- Kota J, Gilstring CF, Ljungdahl PO. 2007. Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J. Cell Biol.* 176: 617–628.
- Kota J, Ljungdahl PO. 2005. Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell Biol.* 168: 79–88.
- Kuehn MJ, Schekman R, Ljungdahl PO. 1996. Amino acid permeases require COPII components and the ER resident membrane protein Shr3p for packaging into transport vesicles in vitro. *J. Cell Biol.* 135: 585–595.
- Kurokawa K, Nakano A. 2019. The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus. *J. Biochem.* 165: 109–114.
- Kurokawa K, Okamoto M, Nakano A. 2014. Contact of cis-Golgi with ER exit sites executes cargo capture and delivery from the ER. *Nat. Commun.* 5: 3653.
- Labbadia J, Morimoto RI. 2015. The biology of proteostasis in aging and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 84: 435–464.
- Lacy MM, Ma R, Ravindra NG, Berro J. 2018. Molecular mechanisms of force production in clathrin-mediated endocytosis. *FEBS Lett.* 592: 3586–3605.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
- Lam, K. K. Y. 2009. The role of palmitoylation in endoplasmic reticulum transport and quality control of the yeast polytopic protein Chs3 (Thesis). University of British Columbia. Retrieved from <https://open.library.ubc.ca/collections/ubctheses/24/items/1.0067083>
- Lam KKY, Davey M, Sun B, Roth AF, Davis NG, Conibear E. 2006. Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* 174: 19–25.
- Lau WTW, Howson RW, Malkus P, Schekman R, O’Shea EK. 2000. Pho86p, an endoplasmic reticulum (ER) resident protein in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for ER exit of the high-affinity phosphate transporter Pho84p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 1107–1112.
- Lee MCS, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 87–123.
- Lee S, Lim WA, Thorn KS. 2013. Improved blue, green, and red fluorescent protein tagging vectors for *S. cerevisiae*. *PLoS One* 8: e67902.
- Li X, Gerber SA, Rudner AD, Beausoleil SA, Haas W, Villén J, Elias JE, Gygi SP. 2007. Large-scale phosphorylation analysis of α -factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 6: 1190–1197.
- Lin CH, MacGurn JA, Chu T, Stefan CJ, Emr SD. 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell* 135: 714–725.
- Lipatova Z, Gyurkovska V, Zhao SF, Segev N. 2020. Characterization of constitutive ER-phagy of excess membrane proteins. *PLOS Genet.* 16: e1009255.

- Lipatova Z, Hain AU, Nazarko VY, Segev N. 2015. Ypt/Rab GTPases: Principles learned from yeast. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50: 203–211.
- Liu C, Apodaca J, Davis LE, Rao H. 2007. Proteasome inhibition in wild-type yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Biotechniques* 42: 158–162.
- Liu TT, Gomez TS, Sackey BK, Billadeau DD, Burd CG. 2012. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol. Biol. Cell* 23: 2505–2515.
- Longtine MS, McKenzie A 3rd, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14: 953–961.
- Lopez S, Rodriguez-Gallardo S, Sabido-Bozo S, Muñiz M. 2019. Endoplasmic Reticulum Export of GPI-Anchored Proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 3506.
- Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ, Glick BS. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441: 1002–1006.
- Luhtala N, Odorizzi G. 2004. Bro1 coordinates deubiquitination in the multivesicular body pathway by recruiting Doa4 to endosomes. *J. Cell Biol.* 166: 717–729.
- Ma M, Burd CG, Chi RJ. 2017. Distinct complexes of yeast Snx4 family SNX-BARs mediate retrograde trafficking of Snc1 and Atg27. *Traffic* 18: 134–144.
- MacDonald C, Piper RC. 2016. Cell surface recycling in yeast: mechanisms and machineries. *Biochem. Soc. Trans.* 44: 474–478.
- MacGurn JA. 2014. Garbage on, garbage off: new insights into plasma membrane protein quality control. *Curr. Opin. Cell Biol.* 29: 92–98.
- MacGurn JA, Hsu PC, Emr SD. 2012. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 231–259.
- Mageswaran SK, Dixon MG, Curtiss M, Keener JP, Babst M. 2014. Binding to any ESCRT can mediate ubiquitin-independent cargo sorting. *Traffic* 15: 212–229.
- McDermott H, Kim K. 2015. Molecular dynamics at the endocytic portal and regulations of endocytic and recycling traffics. *Eur. J. Cell Biol.* 94: 235–248.
- Mehrtash AB, Hochstrasser M. 2019. Ubiquitin-dependent protein degradation at the endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Semin. Cell Dev. Biol.* 93: 111–124.
- Meinema AC, Poolman B, Veenhoff LM. 2012. The transport of integral membrane proteins across the nuclear pore complex. *Nucleus* 3: 322–329.
- Miller EA, Beilharz TH, Malkus PN, Lee MCS, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. 2003. Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell* 114: 497–509.
- Mori K. 2015. The unfolded protein response: the dawn of a new field. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* 91: 469–480.
- Morvan J, de Craene JO, Rinaldi B, Addis V, Misslin C, 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.
- Mustacchi R, Hohmann S, Nielsen J. 2006. Yeast systems biology to unravel the network of life. *Yeast* 23: 227–238.
- Nakatogawa H. 2020. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 439–458.
- Natarajan N, Foresti O, Wendrich K, Stein A, Carvalho P. 2020. Quality Control of Protein Complex Assembly by a Transmembrane Recognition Factor. *Mol. Cell* 77: 108–119.e9.
- Nikko E, Pelham HRB. 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic* 10: 1856–1867.

- Ninagawa S, George G, Mori K. 2021. Mechanisms of productive folding and endoplasmic reticulum-associated degradation of glycoproteins and non-glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1865: 129812.
- Noda Y, Hara T, Ishii M, Yoda K. 2014. Distinct adaptor proteins assist exit of Kre2-family proteins from the yeast ER. *Biol. Open* 3: 209–224.
- 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, Christopher Fromme J. 2012. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* 31: 4191–4203.
- Pagant S, Wu A, Edwards S, Diehl F, Miller EA. 2015. Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr. Biol.* 25: 403–412.
- Palade G. 1975. Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science* 189: 347–358.
- Pédélecq JD, Cabantous S, Tran T, Terwilliger TC, Waldo GS. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24: 79–88.
- Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, Marsischky G, Roelofs J, Finley D, Gygi SP. 2003. A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* 21: 921–926.
- Piper RC, Cooper AA, Yang H, Stevens TH. 1995. VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 131: 603–617.
- Poljak K, Selevsek N, Ngwa E, Grossmann J, Losfeld ME, Aebi M. 2018. Quantitative Profiling of N-linked Glycosylation Machinery in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Proteomics* 17: 18–30.
- Prescianotto-Baschong C, Riezman H. 1998. Morphology of the yeast endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell* 9: 173–189.
- Reyes A, Sanz M, Duran A, Roncero C. 2007. Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J. Cell Sci.* 120: 1998–2009.
- Rockenbach 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: 4402–4415.
- Roncero C. 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41: 367–378.
- Roth J, Zuber C. 2016. Quality control of glycoprotein folding and ERAD: the role of N-glycan handling, EDEM1 and OS-9. *Histochem. Cell Biol.* 147: 269–284.
- Rothstein RJ. 1983. One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* 101: 202–211.
- Sacristan C, Manzano-Lopez J, Reyes A, Spang A, Muñoz M, Roncero C. 2013. Oligomerization of the chitin synthase chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol. Microbiol.* 90: 252–266.
- Sacristan C, Reyes A, 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.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.

- Santiago-Tirado FH, Bretscher A. 2011. Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 21: 515–525.
- Sardana R, Emr SD. 2021. Membrane Protein Quality Control Mechanisms in the Endo-Lysosome System. *Trends Cell Biol.* 31: 269–283.
- Sato K, Nakano A. 2003. Oligomerization of a cargo receptor directs protein sorting into COPII-coated transport vesicles. *Mol. Biol. Cell* 14: 3055–3063.
- Sato K, Sato M, Nakano A. 2003. Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Mol. Biol. Cell* 14: 3605–3616.
- Sato M, Sato K, Nakano A. 2004. Endoplasmic Reticulum Quality Control of Unassembled Iron Transporter Depends on Rer1p-mediated Retrieval from the Golgi. *Mol. Biol. Cell* 15: 1417–1424.
- Schiestl RH, Gietz RD. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16: 339–346.
- Schmidt CC, Vasic V, Stein A. 2020. Doa10 is a membrane protein retrotranslocase in er-associated protein degradation. *Elife* 9: 1–31.
- Schuck S. 2020. Microautophagy - distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes. *J. Cell Sci.* 133.
- Schuck S, Gallagher CM, Walter P. 2014. ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J. Cell Sci.* 127: 4078–4088.
- Scott PM, Bilodeau PS, Zhdankina O, Winistorfer SC, Hauglund MJ, Allaman MM, Kearney WR, Robertson AD, Boman AL, Piper RC. 2004. GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat. Cell Biol.* 6: 252–259.
- Seaman MNJ. 2012. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J. Cell Sci.* 125: 4693–4702.
- Seaman MNJ. 2005. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* 15: 68–75.
- Shao S, Hegde RS. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27: 25–56.
- Sherwood PW, Carlson M. 1999. Efficient export of the glucose transporter Hxt1p from the endoplasmic reticulum requires Gsf2p. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 7415–7420.
- Shibuya A, Margulis N, Christiano R, Walther TC, Barlowe C. 2015. The Erv41-Erv46 complex serves as a retrograde receptor to retrieve escaped ER proteins. *J. Cell Biol.* 208: 197–209.
- Shields SB, Piper RC. 2011. How ubiquitin functions with ESCRTs. *Traffic* 12: 1306–1317.
- Sikorski RS, Hieter P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27.
- Singh A, Severance S, Kaur N, Wiltsie W, Kosman DJ. 2006. Assembly, Activation, and Trafficking of the Fet3p-Ftr1p High Affinity Iron Permease Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281: 13355–13364.
- Sontag EM, Samant RS, Frydman J. 2017. Mechanisms and Functions of Spatial Protein Quality Control. *Annu. Rev. Biochem.* 86: 97–122.
- Spang A. 2015. The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane. *Membranes (Basel)*. 5: 84–98.
- Springer S, Malkus P, Borchert B, Wellbrock U, Duden R, Schekman R. 2014. Regulated oligomerization induces uptake of a membrane protein into COPII vesicles independent of its cytosolic tail. *Traffic* 15: 531–545.

- Srivastava A, Woolford CA, Jones EW. 2000. Pep3p/Pep5p complex: a putative docking factor at multiple steps of vesicular transport to the vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156: 105–122.
- 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.
- Stolz A, Besser S, Hottmann H, Wolf DH. 2013. Previously unknown role for the ubiquitin ligase Ubr1 in endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110: 15271–15276.
- Sun Z, Brodsky JL. 2019. Protein quality control in the secretory pathway. *J. Cell Biol.* 218: 3171–3187.
- Sung MK, Huh WK. 2007. Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 24: 767–775.
- Swanson R, Locher M, Hochstrasser M. 2001. A conserved ubiquitin ligase of the nuclear envelope/endoplasmic reticulum that functions in both ER-associated and Matalpha2 repressor degradation. *Genes Dev.* 15: 2660–2674.
- Taxis C, Vogel F, Wolf DH. 2002. ER-golgi traffic is a prerequisite for efficient ER degradation. *Mol. Biol. Cell* 13: 1806–1818.
- Tempio T, Anelli T. 2020. The pivotal role of ERp44 in patrolling protein secretion. *J. Cell Sci.* 133.
- Tong AHY, Evangelista M, Parsons AB, Xu H, Bader GD, Pagé N, Robinson M, Raghibizadeh S, Hogue CWV, Bussey H, Andrews B, Tyers M, Boone C. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294: 2364–2368.
- 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, Durán 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.
- Tsai PL, Zhao C, Turner E, Schlieker C. 2016. The Lamin B receptor is essential for cholesterol synthesis and perturbed by disease-causing mutations. *Elife* 5: e16011.
- Uemura T, Waguri S. 2019. Emerging roles of Golgi/endosome-localizing monomeric clathrin adaptors GGAs. *Anat. Sci. Int.* 2019 95: 12–21.
- Valdez-Taubas J, Pelham H. 2005. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 24: 2524–2532.
- Valdivia RH, Baggott D, Chuang JS, Schekman RW. 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.
- Vashist S, Kim W, Belden WJ, Spear ED, Barlowe C, Ng DTW. 2001. Distinct retrieval and retention mechanisms are required for the quality control of endoplasmic reticulum protein folding. *J. Cell Biol.* 155: 355–367.
- Vashist S, Ng DTW. 2004. Misfolded proteins are sorted by a sequential checkpoint mechanism of ER quality control. *J. Cell Biol.* 165: 41–52.
- Vembar SS, Brodsky JL. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 944–957.

- Verghese J, Abrams J, Wang Y, Morano KA. 2012. Biology of the heat shock response and protein chaperones: budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as a model system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76: 115–158.
- Vietri M, Radulovic M, Stenmark H. 2020. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21: 25–42.
- 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.
- Wang T, Li L, Hong W. 2017. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic* 18: 767–775.
- Wang X, Huang T, Bu G, Xu H. 2014. Dysregulation of protein trafficking in neurodegeneration. *Mol. Neurodegener.* 9: 31.
- Webb GC, Hoedt M, Poole LJ, Jones EW. 1997. Genetic interactions between a pep7 mutation and the PEP12 and VPS45 genes: Evidence for a novel SNARE component in transport between the *Saccharomyces cerevisiae* golgi complex and endosome. *Genetics* 147: 467–478.
- Weber A, Cohen I, Popp O, Dittmar G, Reiss Y, Sommer T, Ravid T, Jarosch E. 2016. Sequential Poly-ubiquitylation by Specialized Conjugating Enzymes Expands the Versatility of a Quality Control Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* 63: 827–839.
- 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.
- Wilkinson S. 2019. ER-phagy: shaping up and destressing the endoplasmic reticulum. *FEBS J.* 286: 2645–2663.
- Winzler EA, Shoemaker DD, Astromoff A, Liang H, Anderson K, Andre B, Bangham R, Benito R, Boeke JD, Bussey H, Chu AM, Connelly C, Davis K, Dietrich F, Dow SW, El Bakkoury M, Foury F, Friend SH, Gentalen E, Giaever G, Hegemann JH, Jones T, Laub M, Liao H, Liebundguth N, Lockhart DJ, Lucau-Danila A, Lussier M, M'Rabet N, Menard P, Mittmann M, Pai C, Rebischung C, Revuelta JL, Riles L, Roberts CJ, Ross-MacDonald P, Scherens B, Snyder M, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Véronneau S, Voet M, Volckaert G, Ward TR, Wysocki R, Yen GS, Yu K, Zimmermann K, Philippsen P, Johnston M, Davis RW. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* 285: 901–906.
- Wu H, Ng DTW, Cheong I, Matsudaira P. 2020. The degradation-promoting roles of deubiquitinases Ubp6 and Ubp3 in cytosolic and ER protein quality control. *PLoS One* 15: e0232755.
- Xu C, Ng DTW. 2015. Glycosylation-directed quality control of protein folding. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16: 742–752.
- Yamamoto K, Fujii R, Toyofuku Y, Saito T, Koseki H, Hsu VW, Aoe T. 2001. The KDEL receptor mediates a retrieval mechanism that contributes to quality control at the endoplasmic reticulum. *EMBO J.* 20: 3082–3091.
- Yorimitsu T, Sato K. 2012. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol. Biol. Cell* 23: 2930–2942.
- Zaremba S, Keen JH. 1983. Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats. *J. Cell Biol.* 97: 1339–1347.
- Zattas D, Hochstrasser M. 2015. Ubiquitin-dependent protein degradation at the yeast endoplasmic reticulum and nuclear envelope. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 50: 1–17.
- Zhao Y, MacGurn JA, Liu M, Emr S. 2013. The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *Elife* 2 : e00459.

- Zheng C, Liu HH, Yuan S, Zhou J, Zhang B. 2010. Molecular basis of LMAN1 in coordinating LMAN1-MCFD2 cargo receptor formation and ER-to-Golgi transport of FV/FVIII. *Blood* 116: 5698–5706.
- Zhou C, Yang Y, Jong AY. 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8: 172–173.
- Zielinska DF, Gnad F, Schropp K, Wiśniewski JR, Mann M. 2012. Mapping N-glycosylation sites across seven evolutionarily distant species reveals a divergent substrate proteome despite a common core machinery. *Mol. Cell* 46: 542–548.
- Ziman M, Chuang JS, Schekman RW. 1996. Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell* 7: 1909–1919.
- Zimmermann J, Chidambaram S, Fischer Von Mollard G. 2010. Dissecting Ent3p: the ENTH domain binds different SNAREs via distinct amino acid residues while the C-terminus is sufficient for retrograde transport from endosomes. *Biochem. J.* 431: 123–134.

ANEXO

PARTE 1. CONSTRUCCIÓN DE QUIMERAS.

Las quimeras cuya construcción se describe en el capítulo I de Resultados y Discusión (**Figura 15**) se diseñaron usando los oligonucleótidos y sitios de corte que se especifican en la tabla 1. A su vez, en la **Figura A1** de la siguiente página se detalla la localización de estos dentro de la secuencia de Chs3. Los plásmidos que contenían las secuencias sintéticas subclonadas se denominaron pMa-RQ-Chs3Trunc (pUC-GW-*Amp*), utilizado para la obtención de los fragmentos iniciales 1 a 7, y pUC57-Construcción sintética III-VII (pUC-GW-*kan*), utilizado para la obtención de los fragmentos 3a, 3b, 8, 7b y 7c (*GeneWiz*).

Tabla 1. Oligonucleótidos y sitios de corte en el plásmido pRS315-Chs3-GFP utilizados en el diseño de las quimeras indicadas.

Construcción	Oligos para amplificar desde secuencia sintética	Enzima para linealizar el plásmido pRS315-Chs3-GFP
Fragmento 1	3-F y GFP-R	HindIII
Fragmento 2	4-F y GFP-R	HindIII
Fragmento 3	4-F y 2-R	HindIII
Fragmento 3a	4-F y R2	Pacl
Fragmento 3b	4-F y R3	Pacl
Fragmento 4	3-F y 2-R	HindIII
Fragmento 5	4-F y 5-R	HindIII
Fragmento 6	1-F y 2-R	HindIII
Fragmento 7	1-F y 6-R	CspCI
Fragmento 7b	1-F y R1	Pacl
Fragmento 7c	1-F y R1	Pacl
Fragmento 8	NF y 2-R	HindIII

Todos los oligonucleótidos usados a lo largo de este trabajo fueron encargados a *Biomers* y *Sigma* detallándose los más importantes en la tabla 5 de este anexo.

PROMOTOR	CCCATTTTCTTCAAAGGTCCTG..... . .					
1	ATGACCGGCT	TGAATGGAGA	TGATCCTGAT	GACTACTATC	TGAACCTTAA	TCAAGATGAA
61	GAGTCTCTAC	TTAGGTCAAG	ACACAGTGTC	GGCTCAGGAG	CACCTCACAG	ACAAGGCTCT
121	TTAGTGCGGC	CCGAAAGAAG	CCGACTGAAC	AATCCTGATA	ATCCACATTT	TTATTATGCG
181	CAGAAAACGC	AGGAGCAGAT	GAATCACCTG	GATGTTTTAC	CATCAAGTAC	CGGTGTA AAC
241	CCAAATGCAA	CTCGTCGGAG	TGGCTCCCTG	CGCTCCAAAG	GCTCAGTGAG	AAGCAAATTT
301	AGTGGCCGCG	AAACGGATAG	CTATCTTTTA	CAAGATATGA	ATACTACTGA	CAAGAAGGCT
361	TCCGTTAAAA	TAAGCGATGA	AGGTGTTGCG	GAAGACGAAT	TTGATAAAGA	TGGTGATGTG
421	GACAATTTTCG	AAGAAAAGCTC	CATGCAGCCC	ATAAAATAAGT	CTATCAAACC	ATTAAGAAAAG
481	GAAACGAATG	ATACATTGTC	ATTTTGGCAG	ATGTA CTGTT	ATTTTCATTAC	GTTTTGGGCA
541	CCTGCTCCAA	TTCTTGCTTT	CTGCGGGATG	CCAAAGAAGG	AAAGACAAAT	GGCGTGGAGA
601	GAAAAGGTTG	CTTTAATTTT	TGTCATCTTG	TACATTGGTG	CGATTGTGGC	TTTTCTGACT
661	TTTGGGTTCA	CTAAAACCGT	TTGTAGTAGT	TCGAAACTAC	GTTTGAAAAA	CAACGAAGTA
721	TCAACAGAAT	TTGTCGTAAT	TAACGGTAAG	GCTTATGAAT	TGGATACTTC	CTCGCTTCC
781	GGTATACAAG	ACGTTGAAGT	AGATTGAGAC	ACTCTCTATG	GGCCCTGGTC	AGATGCTTGGT
841	AAAGATGCTT	CGTTCTTGTT	TCAAAATGTG	AATGGTAACT	GTCATAACCT	TATAACTCCA
901	AAGAGTAATT	CTTCCATTCC	CCATGACGAT	GATAATAAAT	TAGCATGGTA	TTTTCTTGT
961	AAGTTAAAAG	ATCAAGATGG	CTCTTCGAAG	CCAAACTTCA	CAGTTGAAAA	TTACGCAGGA
1021	TGGAAC TGTC	ACACGTCTAA	AGAAGACAGG	GACGCATTTT	ACGGTTTAAA	ATCGAAAAGCT
1081	GATGTTTACT	TCACTTGGGA	TGGTATAAAG	AACTCTTCTA	GAAACTTGAT	TGTTTATAAT
1141	GGCGACGTTT	TGGATTTAGA	TCTCCTTGAT	TGGTTGGAAA	AGGATGACGT	TGACTATCCC
1201	GTTGTATTTCG	ATGACTTAAA	GACTTCAAAT	TTACAAGGTT	ATGATCTTTC	GTTGGTTTTG
1261	TCAAATGGGC	ATGAAAGAAA	AATTGCGAGA	TGTTTGAGCG	AAATTATTAA	AGTTGGTGAA
1321	GTAGACTCCA	AAACCGTCGG	TTGTATTGCC	TCTGATGTCG	TTTTGTATGT	TTCTCTGGTA
1381	TTTATTCTTT	CAGTGGTGAT	AATTA AATTC	ATAAATGCTT	GCTACTTCCG	TTGGACTGTA
1441	GCTAGGAAAC	AAGGTGCATA	TATCGTGGAC	AATAAAACAA	TGGATAAACA	CACAAAACGAT
1501	ATCGAGGATT	GGTCTAATAA	TATTC AAACA	AAAGCTCCTC	TAAAGGAAGT	AGATCCTCAT
1561	TTGAGGCCAA	AGAAATACTC	AAAAAAGTCC	TTGGGACACA	AGCGTGCTTC	AACCTTTGAC
1621	TTGCTGAAAA	AACACAGCTC	CAAAATGTTT	CAATTTAACG	AATCTGTGAT	AGACTTAGAC
1681	ACCTCCATGA	GCAGTTCACT	ACAATCTTCT	GGTTCATACA	GAGGAATGAC	ACAAC TAGCC
1741	ACTCAAAATG	CTTGGAAACT	CTCGAATGAA	AACAAAGCTG	TACATTCCCG	TAATCCATCT
1801	ACTTTGTTGC	CTACATCCTC	GATGTTTTGG	AATAAAGCGA	CTTCTCTCC	TGTACCAGGA
1861	TCATCGCTGA	TTCAGAGTCT	TGATTGACG	ATTATACATC	CCGATATCGT	TCAACAACCA
1921	CCATTGGATT	TTATGCCATA	CGGGTTCCCA	TTGATTCATA	CTATCTGTTT	TGTTACTTGT
1981	TATTCTGAGG	ATGAAGAGGG	TTTAAGAACC	ACTTTAGACT	CTCTTTCTAC	CACAGATTAT
2041	CCAAATTTCC	ATAAACTACT	GATGGTTGTT	TGTGATGGTT	TAATTAAGGG	CTCGGGTAAC
2101	GATAAGACTA	CTCCAGAGAT	AGCGTTAGGA	ATGATGGACG	ACTTTGTCAC	CCCGCCTGAT
2161	GAAGTTAAAC	CTTACTCCTA	TGTGGCAGTG	GCATCAGGCT	CTAAAAGACA	CAATATGGCC
2221	AAGATATATG	CGGGTTTTTA	TAAATATGAC	GATTCTACAG	TTCCACCAGA	AAATCAACAA
2281	CGTGTCCTAA	TCATTACAAT	TGTGAAAGTGC	GGTACTCCTG	CAGAGCAGGG	GGCCGCCAAA
2341	CCCGGTAACA	GAGGTAAGCG	TGATTCTCAA	ATTATTCTGA	TGTCCTTTTT	AGAAAAAATA
2401	ACATTTGATG	AAAGAATGAC	TCAATTGGAA	TTTCAGCTTT	TAAAAAATAT	TTGGCAGATT
2461	ACGGGGCTAA	TGGCAGACTT	CTACGAAACG	GTACTTATGG	TTGATGCTGA	TACTAAAGTC
2521	TTTCCCAGAT	CTTTA ACTCA	TATGGTCGCT	GAAATGGTTA	AAGATCCTTT	GATTATGGGT
2581	CTTTGTGGTG	AGACCAAGAT	CGCTAATAAG	GCACAATCTT	GGGTA ACTGC	AATTC AAGTG
2641	TTTGAGTACT	ATATTTGCGA	TCATCAGGCT	AAAGCTTTTG	AATCTGTCTT	CGGTTCCGGTA
2701	ACTTGTTTGC	CGGGATGTTT	CTCAATGTAT	CGTATAAAAT	CTCCTAAAGG	TTCAGATGGT
2761	TATTGGGTAC	CTGTATTGGC	AAATCCAGAT	ATTGTTGAAA	GATATTCGGA	TAATGTTACA
2821	AACACTTTGC	ATAAGAAGAA	CTTATTATTA	CTTGGTGAAG	ATAGATTTTT	ATCTTCATTA
2881	ATGTTAAAAG	CTTTCCCTAA	GAGAAAGCAA	GTATTTGTTT	CAAAAGCTGC	TTGTAAA ACT
2941	ATTGCCCTTG	ATAAATTC AA	AGTCTTACTT	TCCAGCGTC	GAAGATGGAT	TAATTCTACG
3001	GTACATAACC	TTTTTTGAATT	AGTTC TAATC	AGGGACTTAT	GTGGCACTTT	CTGTTTTTCC
3061	ATGCAATTTG	TGATTGGTAT	TGAATTGATT	GGTACTATGG	TACTGCCGTT	AGCCATTTGC
3121	TTTACTATTT	ATGTCATTAT	TTTTTGCCATT	GTATCAAAAC	CTACACCCGT	AATCACTTTA
3181	GTTTTACTGG	CAATTATTCT	TGGTCTGCCC	GGCTTAATTG	TTGTTATAAC	TGCTACGAGA
3241	TGGTCGTACC	TATGGTGGAT	GTGCGTATAT	ATTTGTGCTT	TGCCATTTTG	GAATTTGCGTA
3301	CTACCTTCAT	ATGCGTACTG	GAAATTTGAT	GACTTCTCAT	GGGGTGATAC	GAGAACTATT
3361	GCGGGAGGTA	ATAAAAAGGC	ACAAGACGAG	AATGAAGGTG	AATTTGATCA	CTCAAAGATT
3421	AAAATGAGGA	CATGGAGGGA	ATTTGAAAGG	GAAGATATTC	TCAATCGGAA	GGAGGAAAGT
3481	GACTCCTTAG	TTGCAcgc..... . .	AAGAATTGGGACA ACTCCAGT			

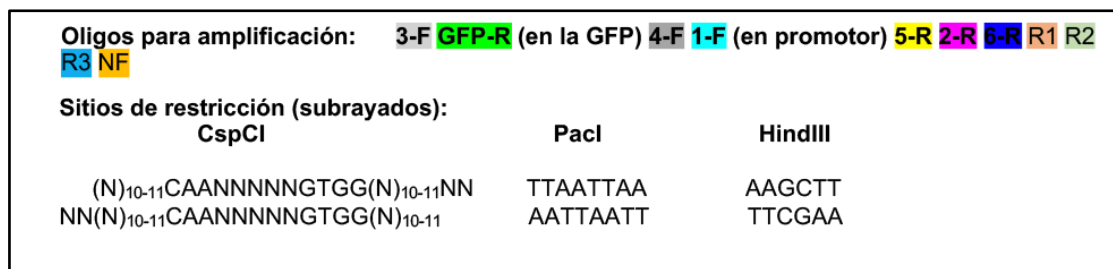


Figura A1. Figura explicativa del diseño de quimeras sobre la secuencia de Chs3 en el plásmido pRS315-Chs3-GFP. El último triplete de la secuencia (cgc) constituye la secuencia de enganche con la GFP en el plásmido pRS315. Los oligos localizados en el promotor (1-F) y la GFP (GFP-R) se representan en los extremos al estar por delante o por detrás de la ORF.

PARTE 2. CEPAS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Tabla 2. Estirpes de *S.cerevisiae* empleadas en este trabajo. N/A= No asignado (Se usaron durante la estancia en el laboratorio del Dr. Khmelinskii en el IMB, Mainz).

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 laboratorio
CRM1590	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM101	W303; MAT α; <i>chs3Δ::URA3</i>	Colección laboratorio
CRM1348	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM4372	W303; Mat a; <i>chs7Δ::HIS3 chs3Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM659	BY4741; Mat a; (<i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>)	Colección laboratorio
CRM1435	BY4741; Mat a; <i>chs3Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM3463	BY4741; Mat a; <i>chs3Δ::NAT hsp104Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
N/A	UPS array: BY4741; <i>orfΔ::kanMx</i> (Laboratorio A. Khmelinskii)	Kong et al. (2021)
N/A	KO array: BY4743; <i>orfΔ::kanMx</i> (Laboratorio A. Khmelinskii)	Winzeler et al. (1999)

Cepa	Genotipo	Origen/ Referencia
CRM4434	Y8205; Mat α ; <i>can1Δ::STE2pr-SpHIS5 lyp1Δ::STE3pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0</i>	A. Khmelinskii
CRM4459	Y8205; Mat α ; <i>Chs3-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4461	Y8205; Mat α ; <i>Chs7-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4536	Y8205; Mat α ; <i>Chs7-mCherry-SfGFP::hph chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM4486	Y8205; Mat α ; <i>Fragmento3a (Chs3)-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4502	Y8205; Mat α ; <i>Fragmento7(Chs3)-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4487	Y8205; Mat α ; <i>Chs3^{C1014/1018A} mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4506	Y8205; Mat α ; <i>Fragmento2(Chs3)-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM4508	Y8205; Mat α ; <i>Chs7^{Δ22}-mCherry-SfGFP::hph</i>	Este trabajo
CRM3422	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT doa10Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM3427	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT hrd1Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4391	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT asi1Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4687	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT asi1Δ::kanMx4 chs7Δ::HIS3</i>	Este trabajo
CRM3460	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT ubr1Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4644	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT ylr108cΔ::hph</i>	Este trabajo
CRM4215	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT cne1Δ::hph chs7Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4569	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT scj1Δ::kanMx4 jem1Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4567	W303; Mat α ; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT scj1Δ::kanMx4 jem1Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2179	W303; Mat a; <i>Chs5-mCherry::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM2879	W303; Mat a; <i>Sec7-mRuby2::kanMx4</i>	Colección laboratorio
CRM3952	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7SfGFP::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4757	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7-SfGFP::URA3</i>	Este trabajo
CRM4539	W303; Mat α ; <i>chs3Δ::URA3 erv14Δ::kanMx4</i>	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen/ Referencia
MMY978	<i>chs3Δ::LEU2 erv14Δ::KanMx6; (ura3 leu2 his3 trp1 ade2)</i>	M. Muñiz
CRM4556	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 erv14Δ::kanMx4 chs7Δ::HIS3</i>	Este trabajo
CRM4738	W303; Mat a; <i>chs3Δ::LEU2 erv14Δ::kanMx4 Chs7-SfGFP::URA3</i>	Este trabajo
CRM4559	<i>sec31-1(ts); Mat α; chs3Δ::LEU2 chs7Δ::HIS3; (ura3 leu2 trp1 his3 met15)</i>	Este trabajo
CRM4592	<i>sec31-1(ts); Mat α; chs3Δ::LEU2 Chs7-SfGFP::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4638	<i>sec23(ts); Mat α; chs3Δ::kanMx4; (ura3 leu2)</i>	Este trabajo
CRM4649	<i>sec23(ts); Mat α; chs3Δ::kanMx4 chs7Δ::NAT; (ura3 leu2)</i>	Este trabajo
CRM4685	<i>sec23; Mat α; Chs7-SfGFP::kanMx4 chs3Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4216	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT atg1Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4218	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT apl6Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM1951	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 vps27Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM4228	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT vps27Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4673	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7-SfGFP::kanMx4 vps10Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4767	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT vps10Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4298	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7SfGFP::kanMx4 apl6Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4300	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7SfGFP::kanMx4 atg1Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4374	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7SfGFP::kanMx4 vps27Δ::hph</i>	Este trabajo
MM1012	<i>chs3Δ::LEU2 rer1Δ::kanMx6; (ade2 trp1 ura3 leu2 his3)</i>	M. Muñiz
CRM4390	<i>chs3Δ::LEU2 rer1Δ::kanMx6 chs7Δ::hph; (ade2 trp1 ura3 leu2 his3)</i>	Este trabajo
CRM4207	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT sec28Δ::kanMx4</i>	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen/ Referencia
CRM4735	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT sec28Δ::kanMx4 Chs7-SfGFP::URA3</i>	Este trabajo
CRM4736	W303; Mat a; <i>chs3Δ::LEU2 rer1Δ::kanMx4 Chs7-SfGFP::URA3</i>	Este trabajo
CRM4676	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7-SfGFP::kanMx4 erv46Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4684	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT erv46Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4733	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT erv46Δ::hph chs7Δ::HIS3</i>	Este trabajo
CRM1278	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs5Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM4759	W303; Mat a; <i>chs3Δ::URA3 ubp3Δ::hph Chs7-SfGFP::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4762	W303; Mat a; <i>chs3Δ::URA3 chs6Δ::kanMx4 Chs7-SfGFP::HIS5</i>	Este trabajo
CRM4764	W303; Mat a; <i>chs3Δ::URA3 aps1Δ::kanMx4 Chs5-mCherry::NAT Chs7-SfGFP::HIS5</i>	Este trabajo
CRM4604	W303; Mat a; <i>gga2Δ::hph gga1Δ::NAT chs3Δ::kanMx4</i>	Colección laboratorio
CRM4615	W303; Mat a; <i>gga2Δ::hph gga1Δ::NAT chs3Δ::kanMx4 chs7Δ::HIS3</i>	Este trabajo
CRM4705	W303; Mat a; <i>gga2Δ::hph gga1Δ::NAT chs3Δ::kanMx4 Chs7-SfGFP::URA3</i>	Este trabajo
CRM4510	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7-VC::HIS3</i>	Este trabajo
CRM4780	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs7-VC::HIS3 chs5Δ::kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4581	W303; Mat a; <i>Chs5-VN::kanMx4 Chs7-VC::HIS3</i>	Este trabajo
CRM4760	W303; Mat a; <i>Chs5-VN::kanMx4 Chs7-VC::HIS3 chs3Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM4732	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Chs5-VC::kanMx4 chs7Δ::HIS3</i>	Este trabajo
CRM3674	W303; Mat a; <i>chs3Δ::URA3 Chs5-VC::kanMx4</i>	Colección laboratorio
CRM4722	W303; Mat a; <i>chs3Δ::NAT Gga2-VC::HIS3</i>	Este trabajo
CRM4723	W303; Mat α; <i>chs3Δ::URA3 chs7Δ::NAT Gga2-VC::HIS3</i>	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos empleados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Origen/Referencia
CRM2389	pMa-RQ-Chs3Trunc (pUC-GW-Amp)	GeneWiz (Construcción sintética subclonada)
CRM3167	pUC57-Construcción sintética III-VII (pUC-GW-kan)	GeneWiz (Construcción sintética subclonada)
CRM4608	pUC-Fusión260-360 (pUC-GW-Amp)	GeneWiz (Construcción sintética subclonada)
CRM4609	pUC-Fusión260-390 (pUC-GW-Amp)	GeneWiz (Construcción sintética subclonada)
CRM264	pRS315 (<i>LEU2</i>)	Colección laboratorio
CRM1256	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i> -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM1297	pRS314:: Δ^{126} <i>Chs3</i>	Colección laboratorio
CRM1285	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i>	Colección laboratorio
CRM1299	pRS314:: Δ^{126} <i>Chs3</i> -GFP	Colección laboratorio
CRM3371	pFA6a- <i>hphNT1</i>	Goldstein & McCusker (1999)
CRM2546	pAG25 (<i>natMx4</i>)	Goldstein & McCusker (1999)
CRM1188	pUG6 (<i>kanMx4</i>)	Goldstein & McCusker (1999)
CRM1191	pUG72 (<i>URA3</i>)	A. Spang
CRM1192	pUG73 (<i>LEU2</i>)	A. Spang
CRM4400	pRS303 (<i>HIS3</i>)	M. Segurado
CRM2037	pFA6a- <i>kanMx6-PGAL1</i>	Longtine et al. (1998)
CRM2330 y 2328	pFA6a-link-yo-mRuby2 (<i>kanMx4</i> , <i>CaURA3</i>)	Lee et al. (2013)
CRM4682 y 4683	pFA6a-link-yo-SuperfolderGFP (<i>HIS5</i> , <i>URA3</i>)	Add gene
CRM3858	pFA6a-SuperfolderGFP:: <i>kanMx4</i>	Pédelacq et al. (2006)
CRM3472	pFA6a-VenusNterminal:: <i>kanMx4</i>	Sung & Huh (2007)
CRM3469	pFA6a-VenusCterminal:: <i>HIS3</i>	Sung & Huh (2007)
CRM3456	pRS315:: <i>Chs3-VN</i> :: <i>HIS3</i>	Anton-Plagaro et al. (2021)

Plásmido	Descripción	Origen/Referencia
CRM1131	pRS315:: <i>Chs3</i> -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM1130	pRS315:: <i>Chs3</i>	Sacristán et al. (2013)
CRM4394	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{C1014/1018A} -GFP	Este trabajo
CRM2205	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{N303/332/371Q} -GFP (<i>Chs3</i> ^{QQQ})	Sacristán et al. (2013)
CRM1335	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{N303Q} -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM1333	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{N332Q} -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM1331	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{N371Q} -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM1330	pRS315:: <i>Chs3</i> ^{N303/371Q} -GFP	Sacristán et al. (2013)
CRM3961	pRS315:: ^{Δ126} <i>Chs3</i> ^{N303/332/371Q} -GFP (^{Δ126} <i>Chs3</i> ^{QQQ})	Este trabajo
CRM4393	pRS315:: ^{Δ126} <i>Fragmento2(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2463	pRS315:: <i>Fragmento1(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2740	pRS426:: <i>Fragmento1(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3015	pRS315:: <i>Fragmento2(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3774	pRS315:: <i>Fragmento2</i> ^{N303/332/371Q} (<i>Chs3</i>)-GFP (Fr2 ^{QQQ})	Este trabajo
CRM2465	pRS315:: <i>Fragmento3(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3268	pRS315:: <i>Fragmento3a(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3285	pRS315:: <i>Fragmento3b(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2466	pRS315:: <i>Fragmento4(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2467	pRS315:: <i>Fragmento5(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2468	pRS315:: <i>Fragmento6(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM2878	pRS315:: <i>Fragmento7(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3264	pRS315:: <i>Fragmento7b(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3266	pRS315:: <i>Fragmento7c(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM3287	pRS315:: <i>Fragmento8(Chs3)</i> -GFP	Este trabajo
CRM4430	pMaM17 (pFA6a-mCherry-SuperfolderGFP:: <i>kanMX4</i>)	A. Khmelinskii
CRM4449	pFA6a-mCherry-SuperfolderGFP:: <i>hphNT1</i>	Este trabajo
CRM2919	pRS314:: <i>Sed5</i> -mRFP:: <i>TRIP1</i>	M. Muñiz
CRM3102	pUG36:: <i>yeGFP-Atg8 (URA3)</i>	A. Jimenez

Plásmido	Descripción	Origen/Referencia
CRM1661	YCplac33- <i>Sec13</i> -mCherry (<i>URA3</i>)	M. Muñiz
CRM4370	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i> -VN:: <i>kanMx4</i>	Este trabajo
CRM4371	pRS314:: Δ^{126} <i>Chs3</i> -VC:: <i>HIS3</i>	Este trabajo
CRM4395	pRS315:: <i>Chs3</i> -GFP con sitio Paul	Este trabajo
CRM4409	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{238-441}$ -GFP	Este trabajo
CRM4599	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{295-441}$ -GFP	Este trabajo
CRM4597	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{310-441}$ -GFP	Este trabajo
CRM4643	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{260-360}$ -GFP	Este trabajo
CRM4660	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{260-390}$ -GFP	Este trabajo
CRM4596	pRS315:: <i>Chs3</i> $\Delta^{260-441}$ -GFP	Este trabajo
CRM4420	pRS315:: <i>Chs3</i> K118/119/123/136/492/496/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R_ GFP (<i>Chs3</i> ^{15K})	Este trabajo
CRM1721	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i> ^{K1125/1126R} -GFP (Δ^{126} <i>Chs3</i> ^{KK})	Sacristan et al. (2013)
CRM4393	pRS315:: Δ^{126} <i>Fragmento2</i> -GFP	Este trabajo
CRM4664	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i> K136/492/496/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R_ (Δ^{126} <i>Chs3</i> ^{12K}) -GFP	Este trabajo
CRM2138	pRS315:: Δ^{26-125} <i>Chs3</i> -GFP	Sacristan et al. (2013)
CRM2139	pRS315:: Δ^{15-140} <i>Chs3</i> -GFP	Sacristan et al. (2013)
CRM2136	pRS315:: Δ^{63-125} <i>Chs3</i> -GFP	Sacristan et al. (2013)
CRM1255	pRS315:: Δ^{63} <i>Chs3</i> -GFP	Sacristan et al. (2013)
CRM1682	pRS315:: <i>Chs3</i> Δ^{37} -GFP	Colección laboratorio
CRM1290	pRS315:: Δ^{126} <i>Chs3</i> -3xHA	Sacristan et al. (2013)
CRM1084	pRS315:: <i>Chs3</i> -3xHA	Sacristan et al. (2013)
CRM1300	pRS423:: <i>CHS7</i>	Sacristan et al. (2013)

Tabla 4. Cepas de E.coli empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Procedencia
DH5 α	<i>SupE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Stratagene
DH10 β	<i>F- mcrAΔ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1recA1 deoRΔ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ</i>	Stratagene

Tabla 5. Oligonucleótidos más relevantes empleados en este trabajo.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Cys/AlaMD.F	CTTTTTGAATTAGTTCTAATCAGAGACTT AGCTGGCACTTTTCGCTTTTTCCATGCAA TTTGTGATTGGTA	Mutagénesis de las cisteínas 1014 y 1018 de Chs3 por alanina
Chs3PaulMD.F	GTTTTGTCAAATGGGCATGAAAGAAAA TTGCGCGCTGTTTGAGCGAAATTATTAA AGTTGGTGAAGTAGA	Introducción de sitio Paul en la secuencia de Chs3 (en aminoácido 430; cambio AGA por CGC por mutagénesis dirigida)
MD492/496RR.F	CAAGGTGCATATATCGTGGACAATAGAA CAATGGATAGACACACAAACGATATCGA GGATTGGTCTAATA	Mutagénesis de la lisina 496 de Chs3 sobre pRS315:: <i>Chs3</i> ^{14K} -GFP para construir pRS315:: <i>Chs3</i> ^{15K} -GFP
CHS3FRII- NNNQQQ.F	ACGGCGGTAAAAAATTCGTGAGA ACGGCGGTAAAAAATTCGTGAGA ACAGTCCAACGGAAGTAGCAGG	Amplificación de región luminal desde pRS315:: <i>Chs3</i> ^{QQQ} -GFP para construir el vector pRS315:: <i>Fr2</i> ^{QQQ} -GFP
CHS3FRII- NNNQQQ.R	ACAGTCCAACGGAAGTAGCAGG	
1-F	CCC ATT TTC TTC AAA GGT CCT G	Construcción quimeras
3-F	GGT GCG ATT GTG GCT TTC CTG	Construcción quimeras
4-F	ATA ATT GCC TGC TAC TTC CG	Construcción quimeras
NF	ATCGTTCAACAACCACCACTGG	Construcción quimeras
2-R	TCG ACG CTG GGA AAG TAA GAC	Construcción quimeras
5-R	CGC AAT AGT TCT CGT ATC ACC CCA	Construcción quimeras
6-R	CCA ATC CTC GAT ATC GTT TGT G	Construcción quimeras
GFP-R	AAG AAT TGG GAC AAC TCC AGT	Construcción quimeras
R1	TGGTACAGGAGAGGAAGTCGCT	Construcción quimeras
R2	CTCTGCAGGAGTACCGCACTTC	Construcción quimeras
R3	ATTAGCGATCTTGGTCTCACCA	Construcción quimeras
DelN-glic.F	CTGACTTTTGGTTTCACTAAAACCGTTT GTAGTAGTTTCGAAACTACGTTTGAAAA CAACGTAGACTCCAAAACCGTCGGTTGT ATTGCCTCTGATGTCGTTTTGTATGTTTC TCTGGTA	Oligo forward para construir el vector pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ238-441} -GFP
Del260-441.F	TCAACAGAATTTGTCGTAATTAACGGTA AGGCTTATGAATTGGATACTTCTCGCG TTCCGTAGACTCCAAAACCGTCGGTTGT ATTGCCTCTGATGTCGTTTTGTATGTTTC TCTGGTA	Oligo forward de fusión para construir el vector pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ260-441} -GFP

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Del295-441.F	TGGTCAGATGCTGGTAAAGATGCTTCGT TCTTGTTTCAAATGTGAATGGTAACTG TCATGTAGACTCCAAAACCGTCGGTTGT ATTGCCTCTGATGTCGTTTTGTATGTTTC TCTGGTA	Oligo forward de fusión para construir el vector pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ295-441} -GFP
Del310-441	AATGGTAACTGTCATAACCTTATAACTC CAAAGAGTAATTCTTCCATTCCCATGA CGATGTAGACTCCAAAACCGTCGGTTGT ATTGCCTCTGATGTCGTTTTGTATGTTTC TCTGGTA	Oligo forward de fusión para construir el vector pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ310-441} -GFP
Fus260.F	TCAACAGAATTTGTCGTAAT	Oligo forward para amplificar secuencia sintética para construir los vectores pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ260-360} -GFP y pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ260-390} -GFP
Fus360/390.R	CAATACAACCGACGTTTTTG	Oligo reverse para amplificar secuencia sintética para construir pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ260-360} - GFP y pRS315:: <i>Chs3</i> ^{Δ260-390} - GFP
Chs3CtVenus.F 2	GGGAATTTGAAAGGGAAGATATTCTCAA TCGGAAGGAGGAAAGTGA CTCCGGTGC ACGGATCCCCGGGTT	Oligo forward para la síntesis del casete necesario para construir pRS314/pRS315:: ^{Δ126} <i>Chs3</i> - <i>VC/VN::HIS3/kanMx4</i>
Chs3CtVenus. R1	CTCAAATAAATAAGTTACACACAACCAT ATATCAACTTGTAAGTATCACATCGATG AATTCGAGCTCGTT	Oligo reverse para la síntesis del casete necesario para construir pRS314/pRS315:: ^{Δ126} <i>Chs3</i> - <i>VC/VN::HIS3/kanMx4</i>
Chs3D-pUG-F	CGGTTATAAACGTTTACCGATTTGCAAA GTTCCAGCTGAAGCTTCGTACG	Delección de <i>CHS3</i> con serie pUG
Chs3D-pUG-R	CTGTAATTGCCTTAGCCACGTAATATGT GCGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección de <i>CHS3</i> con serie pUG
Chs3DNATMx4 .F	GGTCCCATTCTTCAAAGGTCCTGTTT AGACTATCCGCAGGAAAGAAATTAGAC GACATGGAGGCCAGAAT	Delección de <i>CHS3</i> con pAG25(NAT)
Chs3DNATMx4 .R	TAAATAAGTTACACACAACCATATATCAA CTTGTAAGTATCACAGTAAAAAACA CTG GATGGCGGCGTTA	Delección de <i>CHS3</i> con pAG25(NAT)
Chs3D.testNew F	ATTGGCGCTGGCGCAGACCT	Comprobación de delección de <i>CHS3</i>
Chs3D.testNew R	TCCCTTGAAAGAGACAGAACGCGT	Comprobación de delección de <i>CHS3</i>
Chs3- Cterm.testF	TGTGCGTATATTTGTGCTTTGCC	Marcaje de <i>CHS3</i> en C-terminal

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
DChs7-pAG25.F	ATTATCAAAAATTGTGGTTTTGTTAATAC AAAAGCTGATATATATATAATCGACATG GAGGCCAGAAT	Delección de <i>CHS7</i>
DChs7-pAG25.F	TAATAGTATACACCTATTTTCTATATATG GTAATAGAAAAAGAAGCATTGACACTG GATGGCGGCGTTA	Delección de <i>CHS7</i>
Chs7DelHis.F	ATTATCAAAAATTGTGGTTTTGTTAATAC AAAAGCTGATATATATATAATCATCAGA GCAGATTGACTGAGAGGC	Delección de <i>CHS7</i> con pRS303(<i>HIS3</i>)
Chs7DelHis.R	TAATAGTATACACCTATTTTCTATATATG GTAATAGAAAAAGAGCATTGCGCATCTG TGCGGTATTTACACCG	Delección de <i>CHS7</i> con pRS303(<i>HIS3</i>)
Chs7testDelA(F)	AGCTGTCTCCACGTGGAAG	Comprobación de delección de <i>CHS7</i>
Chs7testDelB(R)	TCGTAGAACCCTCTCATGGA	Comprobación de delección de <i>CHS7</i>
Chs7-Sf-Cterm.F	GTGTAAGTGTTAGCAAGGACGGTGACG TGGTGTATGATAATGGATTTATGCGGAT CCCCGGTTAATTAA	Marcaje de <i>CHS7</i> en C-terminal con SfGFP
Chs7-Sf-Cterm.F	TAATAGTATACACCTATTTTCTATATATG GTAATAGAAAAAGAAGCATTGAATTCCG AGCTCGTTTAAAC	Marcaje de <i>CHS7</i> en C-terminal con SfGFP
Chs7-Cterm.testF	TGGGGCTATTTTCTTTGTAGC	Comprobación de marcaje en el C-terminal de <i>CHS7</i>
Chs7Cter.F2	GTGTAAGTGTTAGCAAGGACGGTGACG TGGTGTATGATAATGGATTTATGGGTCG ACGGATCCCCGGGT	Marcaje de <i>CHS7</i> en C-terminal con VENUS
Chs7Cter.R1	TAATAGTATACACCTATTTTCTATATATG GTAATAGAAAAAGAAGCATTTCGATGA ATTCGAGCTCGTT	Marcaje de <i>CHS7</i> en C-terminal con VENUS
Hrd1D.F	ATCTATCAATTGCAATTTGTAAGAGAAG GGGAGAAAGACAAAATAATAATCGACAT GGAGGCCAGAAT	Delección de <i>HRD1</i>
Hrd1D.R	CAGTAGTTTTTTCTTTAAAAAAACTAT GTATAATATAAACATGCAATACACTGG ATGGCGGCGTTA	Delección de <i>HRD1</i>
Hrd1D.testF	TTCCATACGTGCCGACAGG	Comprobación de delección de <i>HRD1</i>
Hrd1D.testR	TCAATTCCCAGCTCGCCCCCT	Comprobación de delección de <i>HRD1</i>
Doa10D.F	TAGCCAAGAGTACCACTAATTGAATCAA AGAGACTAGAAGTGTGAAAGTCCGACA TGGAGGCCAGAAT	Delección de <i>DOA10</i>

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Dao10D.R	TATATGTAAATATGCTAGCATTTCATTTTA AATGTAAGGAAGAAAACGCCTACTG GATGGCGGCGTTA	Delección de <i>DOA10</i>
Doa10D.testF	AATCATTAGAGACGGAAAACCTGG	Comprobación de delección de <i>DOA10</i>
Doa10D.testR	ATACATACTCACATAAATAGGCAT	Comprobación de delección de <i>DOA10</i>
AsiD.F	ATTTTATCTGGGTTTTTTTCTTCTTTTTAC AAAGAACTATGCTAAGAATCAGCTGAA GCTTCGTACGC	Delección de <i>ASI1</i>
AsiD.R	GCTCCCAAACGAAAAACCTCTTTTAGAT ACCATGCAAAGTTCTTAACTGCATAG GCCACTAGTGGATCTG	Delección de <i>ASI1</i>
AsiDtest.F	GAGGGCGCCCCTTTATGTTGAAAT	Comprobación de delección de <i>ASI1</i>
AsiDtest.R	TCCTCCTCTAATGATATAATCGCCACTG	Comprobación de delección de <i>ASI1</i>
Apl6D.F	AGAAAGGTAAACCAAAGACAGCAAACAA TCGAAAAGTGGACAACCAGCACAGATT GTA CTGAGAGTGC	Delección de <i>APL6</i>
Apl6D.R	CCTATATCTATATCTATAAATATACATAT TTATATAGTATTATCTCCGAGTTATCGAA ATTAATACGAC	Delección de <i>APL6</i>
Apl6Dtest.F	AGGTTGCGTGGTCGTAAGAGAAGT	Comprobación de delección de <i>APL6</i>
Apl6Dtest.R	CGAAAGGTTAAGCGACAAAAACCT	Comprobación de delección de <i>APL6</i>
Atg1D.F	ACCCCATATTTTCAAATCTTTTTACAAC ACCAGACGAGAAATTAAGAAACAGATTG TACTGAGAGTGC	Delección de <i>ATG1</i>
Atg1D.R	GAAAATATAGCAGGTCATTTGTA CTTAA TAAGAAAACCATATTATGCATCTTATCGA AATTAATACGAC	Delección de <i>ATG1</i>
Atg1Dtest.F	AGAACGCCACATTTTCATCACCT	Comprobación de delección de <i>ATG1</i>
Atg1Dtest.R	ACACACCGAAACCGAAGGAATTC	Comprobación de delección de <i>ATG1</i>
Vps27DpAG25.F	TTTTTGCTAAGGTGAATGAGTAGTGAGT AAAGAACTAAGAACAGTCGACATGGAG GCCAGAAT	Delección de <i>VPS27</i>
Vps27DpAG25.R	AAGCGTAGGTTTTCTTTTTACAATAACAT AGAAAAGGCTACAATAACTGGATGG CGGCGTTA	Delección de <i>VPS27</i>

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Vps27test.F	CAGCAGAATCATCTTGCTCG	Comprobación de delección de <i>VPS27</i>
Vps27test.R	TAGCTGCAAGCCAGGTGGTC	Comprobación de delección de <i>VPS27</i>
Erv46D.F	TGCGGAGTAGGACAGTGATATAACACA CATAGCTAGACACAATAGACATCCAGCT GAAGCTTCGTACGC	Delección de <i>ERV46</i>
Erv46D.R	ATTATGTAGTAGTATGTAGAAAGGGCTC TCCCTATGACAGTCTCTTCCTGCATAG GCCACTAGTGGATCTG	Delección de <i>ERV46</i>
Erv46Dtest.F	TCGAAATATGGCAACTTTTCACTT	Comprobación de delección de <i>ERV46</i>
Erv46Dtest.R	TGTTCTGTTTCTACCTTAAAGCTTC	Comprobación de delección de <i>ERV46</i>

PARTE 3. FIGURAS ADICIONALES.

Papel de Cne1 en el tráfico de Chs3/Chs3^{QQQ} y Chs7.

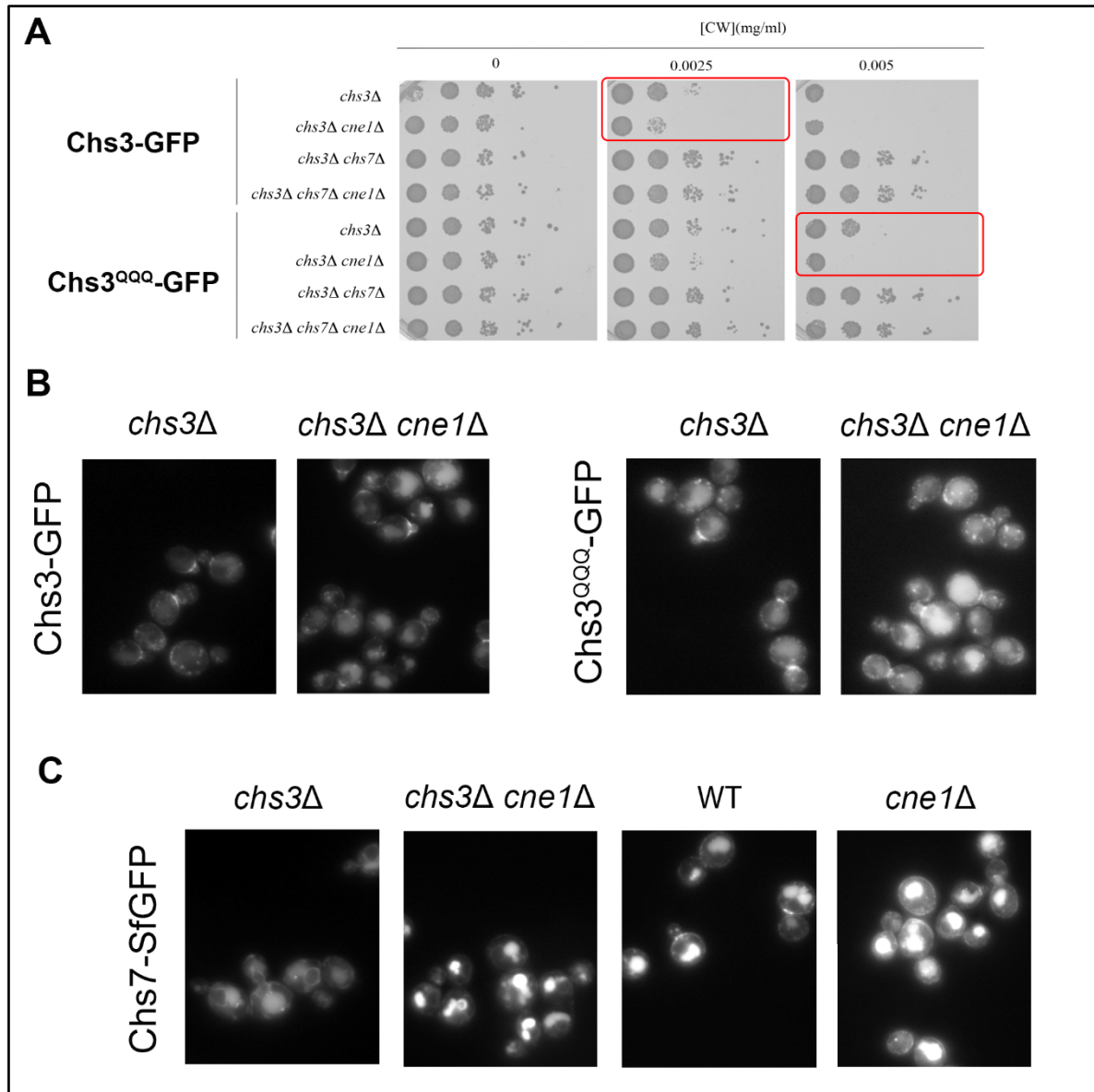


Figura A2. A) Ensayo de gota para evaluar resistencia a CW de Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en los mutantes que se muestran. En rojo se señalan las diferencias en la sensibilidad entre el mutante *chs3Δ* y *chs3Δ cne1Δ* para ambas proteínas. Observar la mayor sensibilidad a CW indicativa de una mayor síntesis de quitina en el mutante de Cne1. Notar que este efecto solo se da en presencia de Chs7 (en su ausencia ninguna de las proteínas sale del RE). B) Localización de Chs3-GFP y Chs3^{QQQ}-GFP en las cepas donde habíamos detectado esa diferencia en la sensibilidad a CW. C) Localización de Chs7-SfGFP en cepas WT, *chs3Δ*, *cne1Δ* y *chs3Δ cne1Δ*. Nótese el mayor tráfico a la vacuola de la proteína en el mutante *cne1Δ*.

Papel de Yos9 en el reconocimiento y degradación de Chs7.

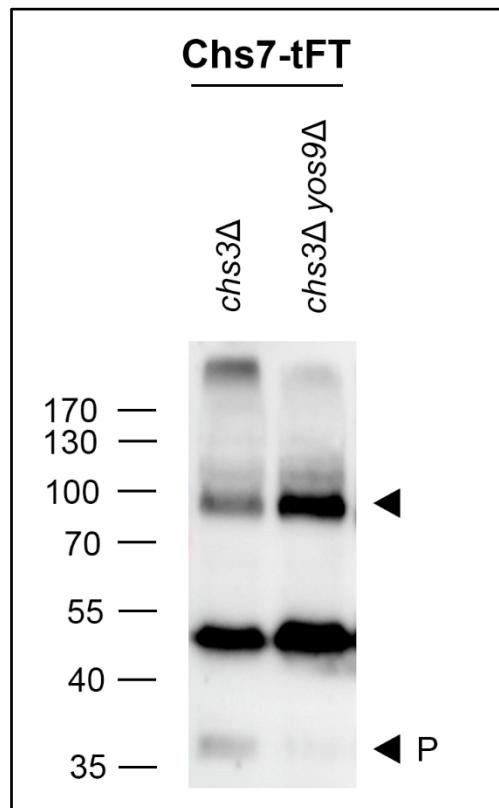


Figura A3. Procesamiento de Chs7-tFT en función de la presencia de Yos9. Nótese claramente la reducción en la banda de procesamiento proteasomal (P) de Chs7-SfGFP en el mutante *yos9Δ* en ausencia de Chs3.

Quimera Δ^{126} Chs3-GFP. Evaluación de su procesamiento en distintos mutantes.

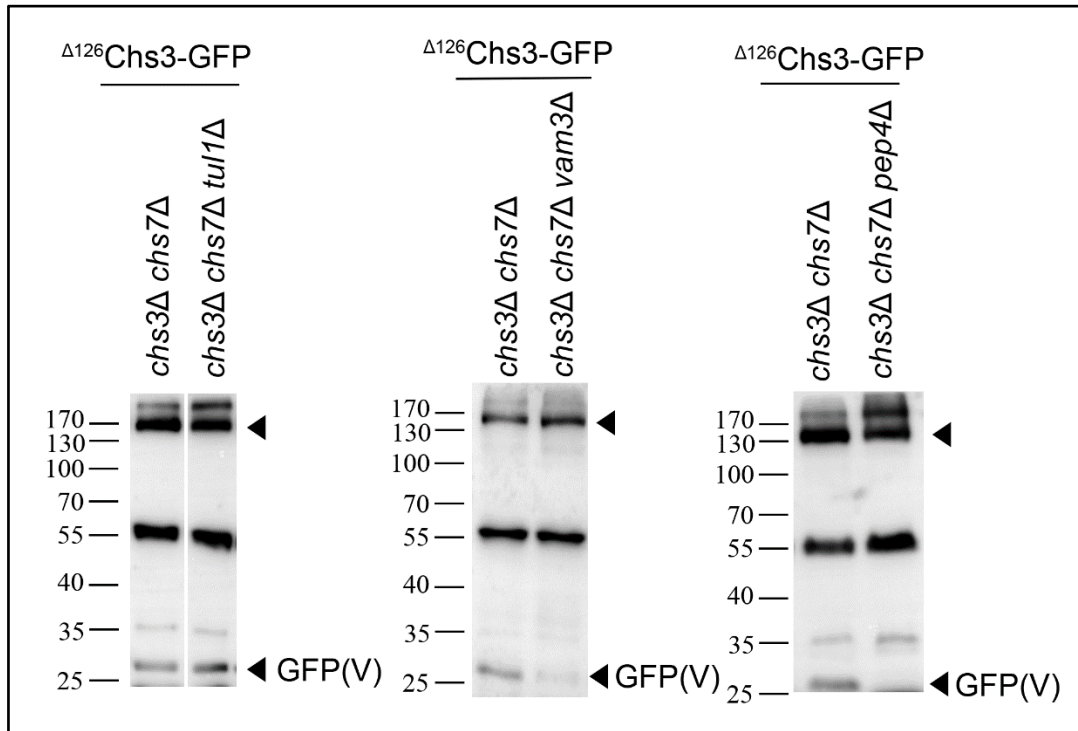


Figura A4. Western Blot de la proteína Δ^{126} Chs3-GFP en los mutantes de *Tul1*, *Vam3* y *Pep4* (*chs7Δ*). Nótese cómo la banda de GFP libre se mantiene por igual en el mutante de *tul1Δ*, mientras que se reduce en el mutante *vam3Δ* y desaparece en *pep4Δ*.

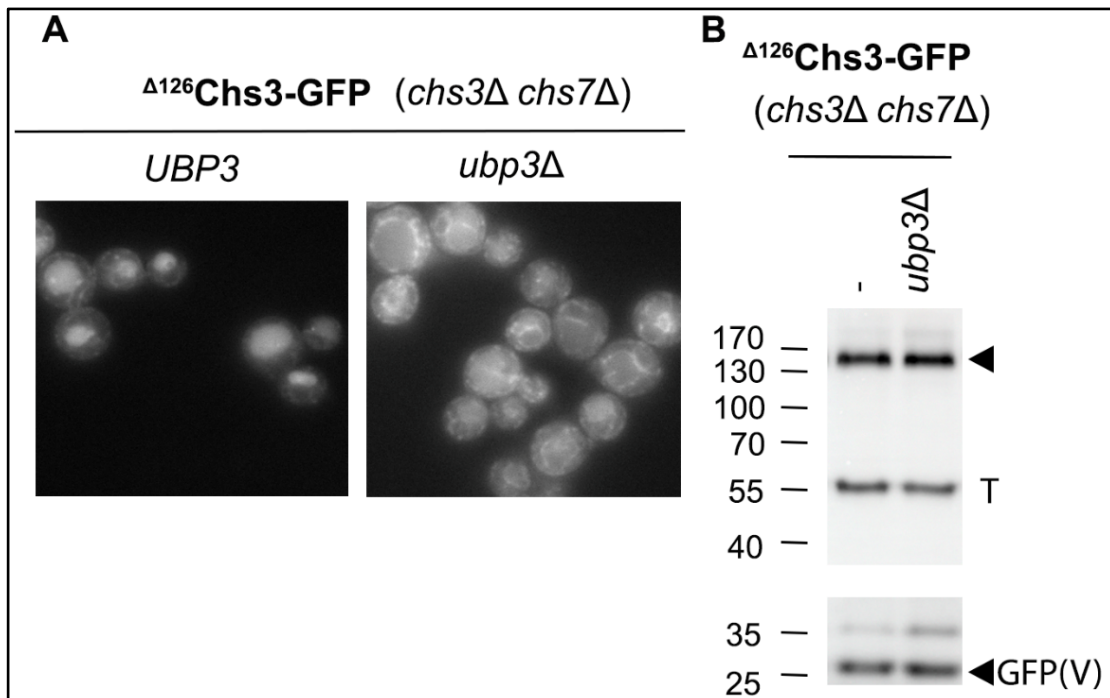


Figura A5. Análisis del papel de Ubp3 en el tráfico independiente de Δ^{126} Chs3-GFP. Nótese la reducción en la tinción vacuolar de la proteína en el mutante *ubp3Δ* (A) que, sin embargo, no se corresponde con un descenso en su procesamiento vacuolar de acuerdo con el Western Blot (B).

Tráfico de Chs3 y la quimera Δ^{126} Chs3 en función de los niveles de expresión de Chs7.

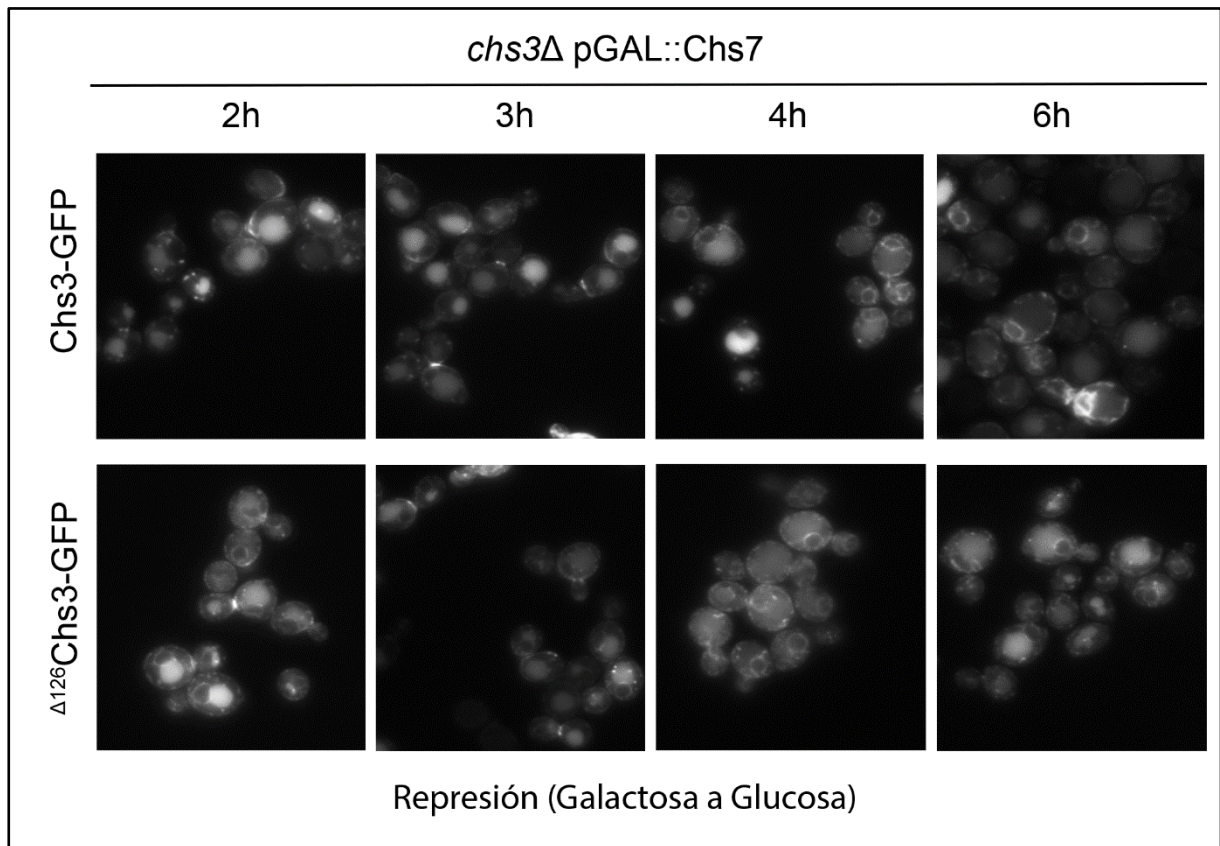


Figura A6. Localización de Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3-GFP tras realizar la represión de la expresión de Chs7 al pasar de un medio con galactosa a otro con glucosa una cepa *chs3Δ* en la que Chs7 se ha puesto bajo el control del promotor de la galactosa (tiempos de incubación en glucosa de 2,3,4 y 6h). Nótese como a medida que se reduce la expresión de la chaperona la quimera y Chs3 dejan de llegar a la MP para seguir una ruta alternativa a la vacuola en el caso de la quimera, o bien para quedarse completamente retenida en el RE en el caso de la proteína silvestre.

La proteína Δ^{126} Chs3 en el mutante del exómero.

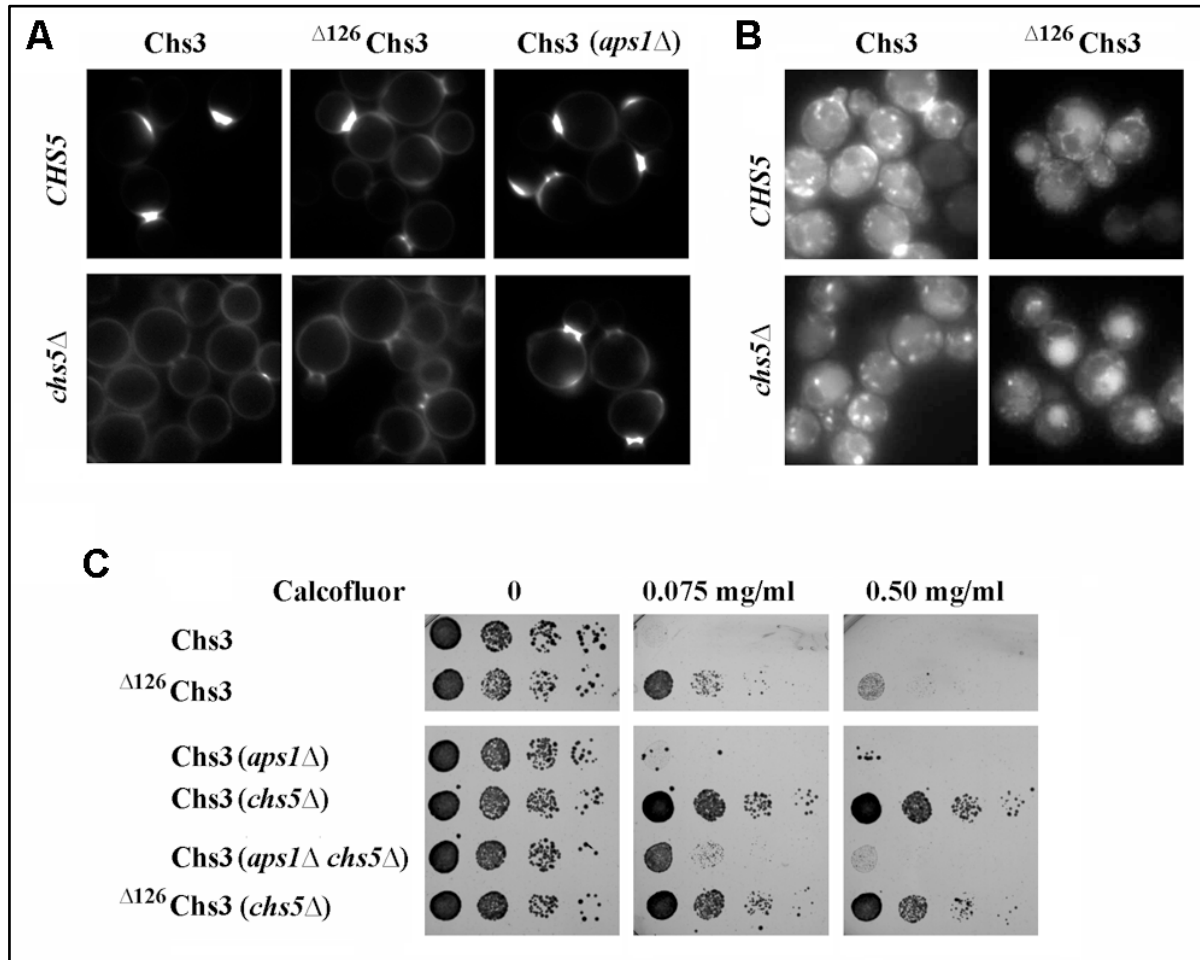


Figura A7. A) Tinción con CW de cepas *CHS5/chs5 Δ* con Chs3 (*APS1*, *aps1* Δ) o Δ^{126} Chs3. Nótese como solamente en el mutante de AP-1 (*aps1* Δ) se revierte la resistencia a CW del mutante *chs5* Δ . B) Localización de Chs3-GFP y Δ^{126} Chs3-GFP en cepas *CHS5/chs5* Δ . Nótese como en presencia de Chs5 las dos proteínas alcanzan la MP, mientras que en el mutante del exómero Chs3-GFP queda retenida en puntos intracelulares (TGN/EE) y Δ^{126} Chs3-GFP se localiza fundamentalmente en la vacuola. C) Ensayo de gota para evaluar la resistencia a CW en las cepas indicadas. Nótese como la mutación de *APS1* revierte el fenotipo de resistencia a CW del mutante *chs5* Δ para Chs3, mientras que la quimera Δ^{126} Chs3 no lo revierte a pesar de carecer de una de las señales de interacción con AP-1 (Starr et al., 2012).