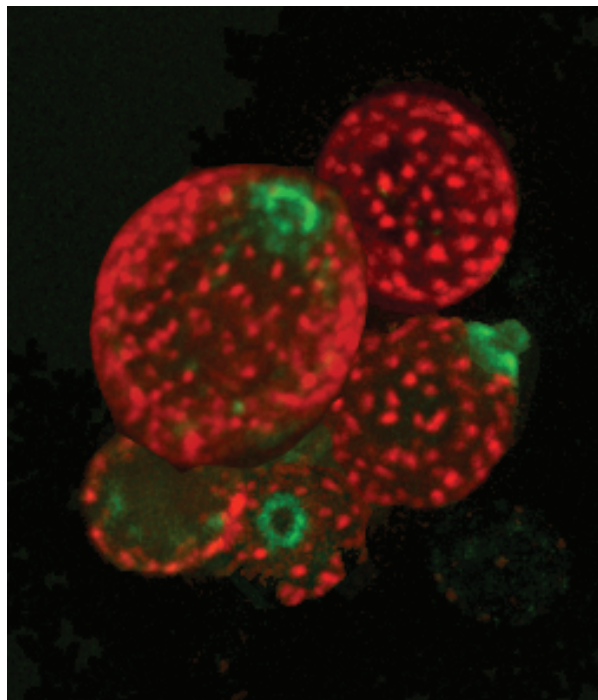




**VNIVERSIDAD D SALAMANCA**  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA

## **TESIS DOCTORAL**

# Regulación del tráfico intracelular de la Actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*



**CARLOS SACRISTÁN LÓPEZ**

SALAMANCA, 2012



Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Biología Funcional y Genómica  
(USAL /CSIC)

---

---



**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**TESIS DOCTORAL**

---

---

**Regulación del tráfico intracelular  
de la actividad Quitín Sintasa III en  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Carlos Sacristán López  
Salamanca, 2012**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

---

**Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Biología Funcional y Genómica  
(USAL /CSIC)**

**Regulación del tráfico intracelular  
de la actividad Quitín Sintasa III en  
*Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada por **Carlos Sacristán López**  
para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

**Salamanca, 2012**





Departamento de  
Microbiología y Genética  
Universidad de Salamanca



Instituto de Biología  
Funcional y Genómica

**D. LUIS FERNÁNDEZ LAGO**, PROFESOR TITULAR DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA y DIRECTOR del DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA de la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

### **CERTIFICA:**

Que la memoria titulada **“Regulación del tráfico intracelular de la actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*”**, presentada por el licenciado Carlos Sacristán López para optar al grado de Doctor en Bioquímica, ha sido realizado bajo la dirección del Dr. César Roncero Maíllo, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a        de        de 2012.

Dr. Luis Fernández Lago







Departamento de  
Microbiología y Genética  
Universidad de Salamanca



Instituto de Biología  
Funcional y Genómica

**D. CÉSAR RONCERO MAÍLLO**, PROFESOR TITULAR del DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA de la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

### **CERTIFICA:**

Que el licenciado Carlos Sacristán López ha realizado el trabajo titulado **“Regulación del tráfico intracelular de la actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*”** bajo mi dirección, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG), centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), para optar al grado de Doctor en Bioquímica.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca, a        de        de 2012.

Dr. César Roncero Maíllo



Tengo que admitir que cuando entré en el laboratorio 219 con la determinación de hacer una tesis no podía imaginarme en qué iba a consistir el camino hasta culminar tal hazaña. Unos cuantos años después, y con alguna que otra dioptría extra como cicatriz de guerra, puedo decir que ha sido una etapa apasionante de mi vida. Si así lo he sentido se lo debo a muchas personas. En primer lugar a César, por su excelente dirección, pero sobre todo por haberme transmitido ese entusiasmo por la ciencia y que ha hecho que mi ilusión por la misma no haya hecho más que crecer.

Nada hubiese sido lo mismo sin los compañeros con los que he tenido el lujo de compartir poyata. Gracias a mis mentoras, Abi, Cris y María, por su paciencia conmigo, y porque esta tesis ha sido en gran parte recoger los frutos previamente plantados por ellas. A Alberto, excelente compañero que me ha demostrado ser incluso mejor amigo. A Charo, por ser la pieza angular del laboratorio y por el mimo con el que hace su trabajo. A Jaqui, por introducir ese punto de espontaneidad y alegría que tanto nos hace falta en el día a día. Ha sido un placer compartir el laboratorio con Irene, Vero y el ex-laboratorio 222, en lo profesional pero sobre todo en lo personal.

Gracias a Ángel Durán por su enorme esfuerzo en poner en funcionamiento el nuevo IBFG; y a todo el equipo de cocina, administración y personal técnico que lo mantienen perfectamente "engrasado", especialmente a Carmen Castro por su siempre disponibilidad y amabilidad. Igualmente estoy agradecido a todos aquellos que científicamente nos han echado una mano cuando el trabajo se ha atascado, especialmente a todos los integrantes del grupo de Pared (YSMs, HVMs, JCRs, PPGs y FRIs). Asimismo, ha sido un privilegio contar con la colaboración directa de excelentes científicos como los doctores Manuel Muñiz, Anne Spang y Per Ljungdahl, de quién tanto aprendí en mi paso por su laboratorio.

Pero sin ninguna duda, lo mejor de esta etapa han sido las grandes personas que he tenido la oportunidad de conocer. Empezando por los entonces becarios sénior de mi inicio de tesis: Sergi, la persona y científico al que algún día me gustaría llegar a parecerme. Javi "Badahó", por introducirme en los deportes de "riesgo". Lorena, que sepas que yo no soy fan de John Boy, sino tuyo. Javi "Pubmed", del que admiro su pasión por la ciencia; igual que admiro a tantos otros ejemplos en los que he podido fijarme a lo largo de estos años: Patri, Toñi, Mario, Rodrigo... La parte negativa es que se acerca el momento de tener que

## AGRADECIMIENTOS

---

ser yo el que deje el Instituto, y es ahora cuando más a gusto me encuentro. A los que hacéis que me sienta así, mil gracias. Especialmente a Sofi, por contagiarme siempre con tus ánimos. A Cami, única e irrepetible. A Diana y su desbordante personalidad. A Raúl y Pepín, porque una carrera y una tesis unen mucho. A Mariona, por ser la promotora de tantas cenas y buenos momentos. A José Ángel, la constancia personificada. Y tantos otros con los que he compartido cafés, pinchos, cenas y demás actividades “extraescolares”: Miguel, Irene, Elvira, Nagore, Marta, Mari, Pedro, Álvaro, Rebeca, Nuria, Maite, Esther, Ali, David...

Gracias también a los amigos de “toda la vida”, porque siempre demuestran estar a la altura de las circunstancias. Aquí el premio especial es para Saúl y Ana, sabéis lo mucho que os debo y sin embargo lo difícil que es expresarlo, espero que un GRACIAS al menos lo esboce. Javi, Esti, resto de “biologuitos” y amigos de Burgos: Pablo, Rodri, Juanma, y Marcos, suena a tópico, pero es que a pesar de que nos veamos poco y que los años pasan, nada cambia cuando nos reencontramos. Y a Vir, porque tu apoyo en esta última etapa de tesis ha sido fundamental, y por demostrarme que siempre hay sorpresas por descubrir.

Finalmente gracias a mi familia, porque a pesar de que las siguientes páginas os resulten incomprensibles, habéis comprendido perfectamente todo lo que hay detrás de ellas. Bea, gracias por abrirme los ojos cuando parece que todo se tuerce. A Chus y Carlita, porque con vosotros reinan las risas en casa. A mis padres gracias por regalarme aquel libro de “Preguntas y respuestas de Carlitos”, quién sabe si semilla de todo esto. Porque a pesar de que mis decisiones implican estar lejos de vosotros, siempre he recibido vuestro apoyo incondicional, ¡Ah! ¡Y por cuidar de Bruce!

# Abreviaturas

aa	Aminoácido
ALP	Fosfatasa Alcalina ( <i>Alkaline Phosphatase</i> )
ASL	Enlace sensible a álcali ( <i>Alkali-Sensitive Linkage</i> )
BN-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones nativas ( <i>Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
CAR	Anillo contráctil de actomiosina ( <i>Contractile Actomyosin Ring</i> )
CCV	Vesícula recubierta de clatrina ( <i>Clathrin-Coated Vesicle</i> )
CFW	Calcofluor White
CPS	Carboxipeptidasa S
CPY	Carboxipeptidasa Y
CWP	Proteína de la pared celular ( <i>Cell Wall Protein</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EndoH	Endoglicosidasa H
ERAD	Degradación asociada al RE ( <i>ER-associated protein degradation</i> )
ERES	Sitios de exportación del RE ( <i>ER Exit Sites</i> )
FBS	Suero Fetal Bovino ( <i>Foetal Bovine Serum</i> )
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica ( <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> )
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
GPI	Glucosil fosfatidil Inositol
GS	Actividad Glucán Sintasa
HA	Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus de la gripe
IF	Inmunofluorescencia
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
LatA	Latrunculina A
MCC	Compartimento de membrana de Can1 ( <i>Membrane Compartment containing Can1</i> )
MCP	Compartimento de membrana de Pma1 ( <i>Membrane Compartment containing Pma1</i> )
MCT	Compartimento de membrana de TORC2 ( <i>Membrane Compartment containing TORC2</i> )
MP/PM	Membrana Plasmática/Plasma Membrane

MMD	Dominio motor de tipo miosina ( <i>Myosin Motor Domain</i> )
MTC	Complejos de amarre multiméricos ( <i>Multisubunit Tethering Complexes</i> )
MVB	Cuerpo multivesicular ( <i>Multivesicular Body</i> )
NPS	Factor promotor de la nucleación de actina ( <i>Nucleation-Promoting Factor</i> )
PIP / PI(4)P	Fosfatidilinositol 4-fosfato
PIP <sub>2</sub> /PI(4,5)P <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PC/CW	Pared Celular/Cell Wall
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
QS/CS	Quitín Sintasa/Chitin Synthase
RFP	Proteína Roja Fluorescente ( <i>Red Fluorescent Protein</i> )
RE/ER	Retículo Endoplasmático/Endoplasmic Reticulum
SD	Medio sintético definido
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i> )
SP	Septo Primario
SS	Septo Secundario
TMD	Dominio Transmembrana ( <i>Transmembrane Domain</i> )
TGN	<i>trans</i> -Golgi Network
UBD	Dominio de unión a ubiquitina ( <i>Ubiquitin-Binding Domain</i> )
UDP	Uridina Difosfato
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas ( <i>Unfolded Protein Response</i> )
WT	Estirpe silvestre
YEPD	Medio de crecimiento rico ( <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> )

# Índice







<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1. La levadura como modelo de estudio del tráfico intracelular	3
2. Ciclo de vida y morfogénesis de <i>S. cerevisiae</i>	3
3. La Pared Celular	4
3.1. Importancia biológica y aplicaciones tecnológicas de la PC de distintos organismos	4
3.2. Estructura general de la PC eucariota	5
3.2.1. Celulosa y quitina	5
3.2.2. La celulosa sintasa de plantas	6
3.2.3. Composición y estructura de la PC de <i>S. cerevisiae</i>	7
4. Síntesis de Quitina	8
4.1. Quitín sintasas fúngicas	8
4.2. Localización y función de las QS de <i>S. cerevisiae</i>	9
4.3. Síntesis de quitina en otros hongos	11
4.4. Función y regulación de la actividad QSIII	12
5. Visión general del tráfico intracelular de proteínas transmembranales	13
5.1. Proteínas con dominios transmembrana	13
5.2. Teoría del transporte vesicular	14
6. Ruta secretora temprana: Retículo Endoplasmático	16
6.1. Translocación y plegamiento de proteínas transmembranales	16
6.2. Salida del RE en vesículas COPII	17
6.3. Transporte retrógrado en vesículas COPI	18
6.4. Control de calidad en el RE	19
6.5. Salida de Chs3 del RE: Chs7 y palmitoilación	20
7. Ruta de secreción tardía	20
7.1. El aparato de Golgi	21
7.1.1. Organización del aparato de Golgi	21
7.1.2. Salida del TGN hacia la membrana plasmática	21
7.2. Organización de la membrana plasmática y endocitosis	22
7.2.1. Dominios de la membrana plasmática	22
7.2.2. Endocitosis	24
7.3. Ruta endocítica: Reciclaje vs Degradación	26
7.3.1. Reciclaje de proteínas transmembranales	26
7.3.2. Degradación de proteínas transmembranales: el camino hacia la vacuola	29
7.4. Chs3 en la ruta de secreción tardía	30
7.4.1. Salida de Chs3 del TGN: El exómero	30
7.4.2. Chs3 en la membrana plasmática y endocitosis: Chs4	31
7.4.3. Reciclaje de Chs3: Vesículas de clatrina	32
7.4.4. Regulación de la actividad QSIII durante conjugación	33
<b>RESULTADOS, METODOLOGÍA Y DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
Capítulo 1: Caracterización de Quitín Sintetas de la Familia 2 de distintos hongos en <i>S. cerevisiae</i>	39
Capítulo 2: El control de la dimerización de Chs3 en el aparato de Golgi y su función en el reciclaje endocítico de la proteína	53
Capítulo 3: La compartimentalización en el cuello es la base molecular del reciclaje endocítico de Chs3 durante el crecimiento vegetativo pero no durante el crecimiento hiperpolarizado	69

<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>85</b>
1. Topología de Chs3 .....	87
2. Papel del dominio CHS .....	89
3. Papel del dominio C-terminal .....	90
4. Papel del dominio N-terminal .....	92
5. La compartimentalización del cuello distingue el comportamiento de Chs3 durante el crecimiento vegetativo y durante la conjugación.....	98
6. Visión general y perspectivas futuras .....	101
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>103</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>107</b>
<b>APÉNDICE: La compleja interacción entre Chs5, ChAPs y Chs3</b>	<b>119</b>
<b>MATERIAL SUPLEMENTARIO*</b>	<b>135</b>
Material Suplementario Capítulo 1 .....	136
Material Suplementario Capítulo 2 .....	137
Material Suplementario Capítulo 3 .....	140
Material Suplementario Apéndice .....	144

**\*EL MATERIAL SUPLEMENTARIO SOLO ESTÁ INCLUIDO EN LA VERSIÓN DIGITAL DE LA MEMORIA**

# I ntroducción





## 1. LA LEVADURA COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR

La alteración del tráfico de proteínas a distintos niveles es la base de gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo desórdenes neurodegenerativos o cáncer [revisado en (Howell et al., 2006)]. Teniendo en cuenta que más del 25% de los genes humanos causantes de enfermedades tiene un homólogo cercano en levaduras (Bassett et al., 1996), *S. cerevisiae* representa un sistema sencillo sobre el que estudiar los mecanismos moleculares afectados en dichas enfermedades. Además, *Saccharomyces cerevisiae* nos ofrece un sistema idóneo en el que estudiar procesos celulares y moleculares básicos gracias a que nos ofrece las siguientes ventajas:

- Rápido crecimiento en medios de cultivos simples y facilidad en el aislamiento de mutantes.
- Fácil manipulación en el laboratorio y sin riesgos gracias a su ausencia de patogenicidad y estatus GRAS (*Generally Recognized as Safe*).
- Sistema sencillo y versátil para la transformación de DNA y manipulación genética.

Muchas proteínas de membrana de levaduras han aportado información muy valiosa acerca de los mecanismos básicos de plegamiento de proteínas politópicas, control de calidad, y transporte en el RE y en compartimentos post-Golgi. Por tanto, el desarrollo de modelos adicionales de regulación del tráfico intracelular es un objetivo interesante. En el trabajo descrito en esta tesis, hemos usado la proteína Chs3 para estudiar algunos de estos procesos. En este sentido, por ejemplo, se ha sugerido que Chs3 supone un buen modelo para el estudio de la regulación de proteínas humanas almacenadas en reservorios intracelulares y cuya localización en la membrana depende de un estímulo (Valdivia & Schekman, 2003). Este es el caso del transportador de glucosa de mamíferos GLUT4, que se almacena en un compartimento estable hasta que la unión de la insulina con su receptor induce su transporte a la membrana plasmática (MP) (Leto & Saltiel, 2012).

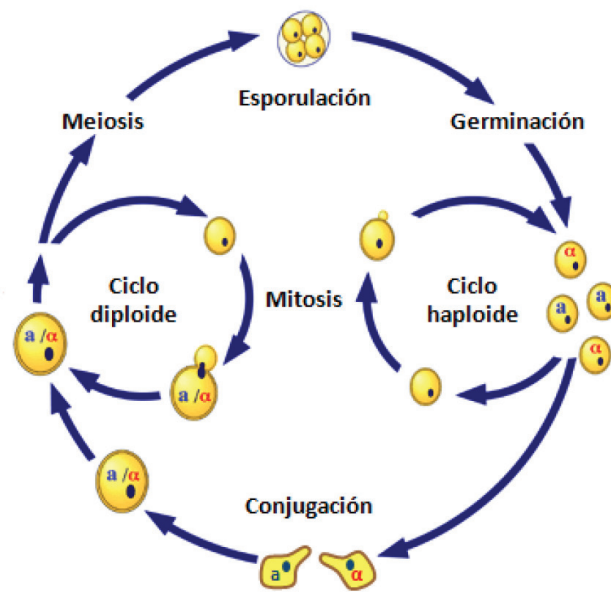
En segundo lugar, el estudio de Chs3 es relevante por su propia función biológica: la síntesis de quitina. Dado que los hongos patógenos dependen de este polisacárido para desarrollar su capacidad invasora, el estudio de los mecanismos implicados en su síntesis es básico a la hora de desarrollar nuevos antifúngicos frente a esta diana.

## 2. CICLO DE VIDA Y MORFOGÉNESIS DE *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* es un organismo unicelular eucariótico cuya morfología es elipsoidal. Presenta tres tipos celulares diferentes: células haploides *a*, células haploides  $\alpha$  y células diploides *a*/ $\alpha$ , jugando cada una de ellas un papel determinado en su ciclo de vida, dependiendo de las condiciones ambientales. Tanto la fase haploide como la diploide son estables y siguen un ciclo mitótico, reproduciéndose de forma asexual mediante gemación. Durante este ciclo mitótico, cuando la célula alcanza un tamaño determinado al final de la fase G1, se produce la emergencia de una célula hija denominada yema (**Figura 1**). El crecimiento inicial de ésta es apical, implicando la polarización del citoesqueleto de actina y la secreción direccional de los componentes necesarios para la formación de la pared celular (PC). Cuando la célula hija alcanza un tamaño determinado, su crecimiento cambia a isotrópico, produciéndose deposiciones de PC uniformemente por toda la yema. Durante estas fases, la superficie de la célula madre no se incrementa. Una vez que la célula hija recibe un núcleo tras la mitosis, tiene lugar la formación del septo que separa físicamente a células madre e hija. Posteriormente se produce la degradación de parte del mismo, originándose la separación física de ambas células. La separación da lugar a la denominada cicatriz de gemación de la célula madre. La célula hija, de tamaño inferior a la célula madre, todavía debe aumentar su tamaño antes de entrar en un nuevo proceso de división.

Además de esta reproducción asexual, las células haploides de tipo sexual opuesto (*a* y  $\alpha$ ) pueden llevar a cabo el proceso denominado conjugación. Como respuesta a la feromona secre-

tada por el tipo sexual opuesto (factores  $\alpha$  y  $a$ , respectivamente), se produce una parada del ciclo celular en G1. Continúa con la transcripción de genes específicos de conjugación y una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que culminan en la creación de unas células diferenciadas muy polarizadas denominadas "shmoos". Cuando dos shmoos de tipo sexual opuesto se fusionan, originan un cigoto diploide  $a/\alpha$  estable que se divide vegetativamente mediante gemación (Bardwell, 2005). Estas células diploides ni producen ni responden a las feromonas anteriormente descritas, pero son capaces de salir del ciclo mitótico en condiciones de estrés nutricional. Cuando esto ocurre, entran en un programa de diferenciación estrictamente regulado que se conoce como esporulación. En primer lugar se origina una parada en fase G1 de la célula diploide, seguida por dos divisiones meióticas sucesivas. Esto conduce a la formación de una estructura especializada que se conoce como asca y que contiene cuatro ascosporas, dos de cada tipo sexual. La pared de las ascosporas es una estructura muy especializada que les permite sobrevivir en condiciones adversas. Cuando las condiciones ambientales son favorables, se produce la germinación de las ascosporas, saliendo de su estado latente y volviendo de nuevo a entrar en el ciclo celular mitótico de las células haploides.



**Figura 1.** Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. Consultar el texto para más detalles

Además, determinadas cepas diploides de *S. cerevisiae* pueden adoptar una forma de crecimiento hiperpolarizada denominada pseudohifa en respuesta a la ausencia de nitrógeno en el medio de cultivo. Cuando esto ocurre, las células se alargan, creciendo de manera unipolar y manteniéndose unidas como cadenas de células que pueden invadir el medio sólido. De manera similar, las células haploides, en respuesta a un agotamiento de la glucosa del medio, pueden desarrollar un crecimiento invasivo haploide, que desemboca a un cambio desde una morfología celular más redondeada y un patrón de gemación axial en la superficie del agar, a células alargadas con un patrón de gemación bipolar que les permite formar filamentos, y gracias a ello, penetrar en el medio de cultivo. Se cree que es una adaptación de los organismos no móviles para buscar alimento en ausencia de nutrientes (Palecek et al., 2002).

### 3. LA PARED CELULAR

#### 3.1 Importancia biológica y aplicaciones tecnológicas de la Pared Celular de distintos organismos

La pared celular (PC) es una estructura que recubre la membrana plasmática (MP), está presente en gran diversidad de grupos taxonómicos como hongos, plantas, algas, bacterias y arqueas. El estudio de la síntesis de la PC en todos estos grupos tiene interés por distintas razones. Por ejemplo, en plantas, un mejor conocimiento de su síntesis y organización permite seleccionar estirpes que resistan mejor el ataque de parásitos (Hématy et al., 2009). En el caso

de agentes infecciosos, como hongos y bacterias, su caracterización permite desvelar elementos susceptibles de ser usados como dianas frente a las que desarrollar nuevos antibióticos.

La naturaleza polisacárida de la PC de los hongos hace de ella una estructura muy interesante desde el punto de vista biotecnológico. Por ejemplo la quitina, un componente básico de la PC fúngica, es un material con importantes y numerosas aplicaciones biotecnológicas. En biomedicina se ha usado como sustrato sobre el que regenerar tejidos humanos; o su forma desaminada, el quitosán, en forma coloidal puede combinarse con diferentes moléculas, y por tanto es un potencial transportador de medicamentos, revisado en [Khoushab & Yamabhai, 2010].

Desde el punto de vista biológico, la PC tiene dos características que hacen de ella una estructura esencial para la supervivencia celular. La primera es que posee un papel eminentemente estructural ya que dota de protección osmótica y física a la célula, al mismo tiempo que se encarga de mantener la morfología celular. La segunda característica es que debe ser capaz de adaptarse rápidamente a los continuos cambios morfológicos que se producen a lo largo del ciclo de vida del organismo, así como responder eficientemente a distintos tipos de estreses ambientales.

El complejo Quitín Sintasa III (QSIII), objeto de esta tesis, es responsable de la síntesis de uno de los componentes estructurales de la PC fúngica, y participa de las dos características comentadas. Por una parte, la quitina que sintetiza es esencial en la propia estructura de la PC, siendo el componente que le dota de rigidez. Además, el complejo QSIII aporta gran dinamismo y adaptabilidad a la PC gracias a una delicada regulación postraduccional que le permite desarrollar su función solo durante momentos determinados del ciclo o en respuesta a daños de la PC.

### **3.2. Estructura general de la pared celular eucariota**

Aunque la PC de los diferentes grupos taxonómicos eucarióticos es muy distinta en composición, a nivel estructural comparten ciertas semejanzas, sobre todo si nos referimos a la PC de hongos y plantas. La arquitectura base consta de una o varias capas fibrilares de origen polisacárido que están entrelazadas entre sí por otros polisacáridos, además de proteínas. Los compuestos fibrilares de los que consta la PC se ensamblan a partir de cadenas lineales de polisacáridos dispuestas paralelas unas respecto a otras, lo que permite que se establezcan puentes de hidrógeno entre ellas. Como producto de esta disposición tan ordenada se obtienen compuestos insolubles y altamente resistentes que otorgan rigidez a la PC. Este es precisamente el ejemplo de los dos polímeros más abundantes en la naturaleza, la celulosa y la quitina.

#### **3.2.1. Celulosa y Quitina**

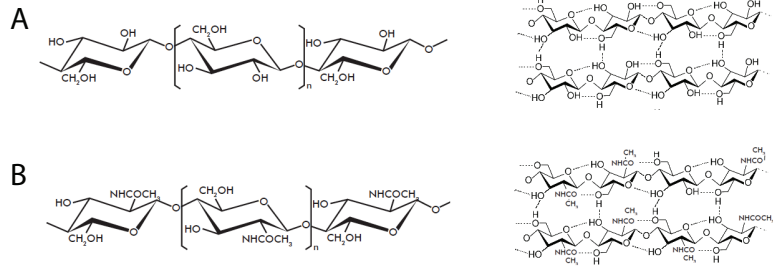
Como se acaba de comentar, la celulosa y la quitina, pese a ser componentes de la PC de grupos filogenéticos muy distintos, comparten características estructurales.

La celulosa es el componente mayoritario de la PC de las plantas y consta de cadenas lineales de glucosa unidas por enlaces  $\beta(1-4)$ . Las cadenas cristalizan entre sí mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals para dar lugar a la formación de microfibrillas (Cosgrove, 2005) (Figura 2A).

La quitina, por su parte, está ampliamente distribuida en la naturaleza, encontrándola en la PC de hongos, arácnidos, crustáceos, nematodos y otros invertebrados como anélidos, moluscos, cefalópodos y hemicordados. Su estructura es similar a la celulosa, solo que en lugar de glucosas su componente estructural son unidades de N-acetilglucosamina, también unidas por enlaces  $\beta(1-4)$ . Así, puede pensarse en la quitina como en celulosa con el grupo hidroxilo en posición 2 de cada monómero reemplazado por un grupo de acetilamina. Esto permite un

**Figura 2. Celulosa y Quitina.**

Comparación de la estructura de una cadena de  $\beta(1,4)$ -glucano (A, izquierda) y una cadena de  $\beta(1,4)$ -N-Acetil-glucosamina (B, izquierda) y su ensamblaje mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno en celulosa (A, derecha) y quitina (B, derecha), respectivamente.



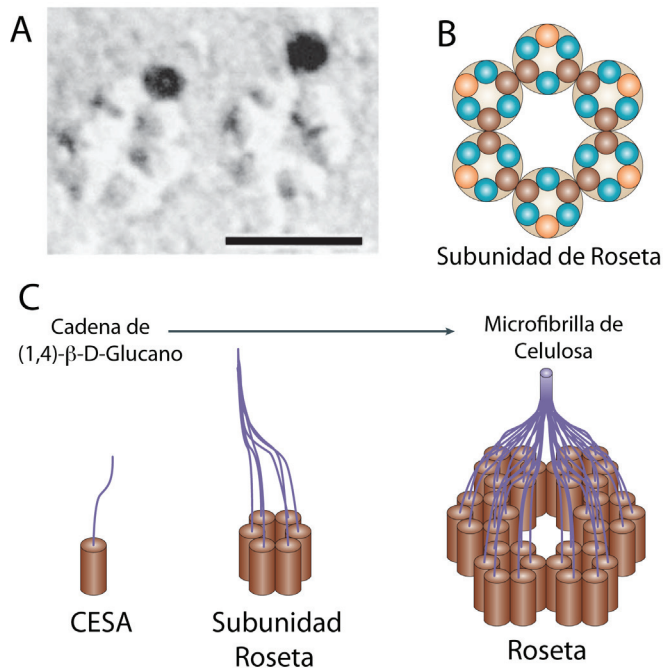
incremento de los enlaces de hidrógeno con los polímeros adyacentes, dándole al material una mayor resistencia (Merzendorfer, 2011) (Figura 2B).

Esta similitud en la estructura de ambos compuestos se ve igualmente reflejada en semejanzas estructurales de las enzimas que los sintetizan, lo que apunta a un origen evolutivo común. De hecho, parte de los resultados logrados en esta tesis sugieren que, al igual que la celulosa sintasa, la QSIII es capaz de formar oligómeros. Es por ello que describiremos a continuación la naturaleza oligomérica de la celulosa sintasa.

**3.2.2. La celulosa sintasa de plantas**

La maquinaria responsable de la síntesis de celulosa se identificó en la MP de distintos organismos mediante microscopía electrónica de criofractura. En *Arabidopsis thaliana* se detectó como una estructura de aproximadamente 20-30 nm de diámetro en forma de roseta constituida por seis subunidades globulares (Figura 3A). Hasta ahora el único componente que se ha identificado que forma parte de estas rosetas es la celulosa sintasa A (CESA). Se ha propuesto que cada uno de los complejos globulares a su vez contiene seis proteínas CesA, que se supone es la subunidad catalítica del complejo. Este modelo implica que cada roseta sintetiza simultáneamente 36 cadenas individuales de glucano que son extruidas hacia el exterior celular (Endler & Persson, 2011) (Figura 3B y C).

En el genoma de *Arabidopsis* se han descrito 10 genes CesA (CesA1-10), habiéndose asignado específicamente algunos a la síntesis de la pared primaria y otros a la pared secundaria. Sin embargo,



**Figura 3. Celulosa Sintasa de plantas.** A) Micrografía electrónica de una subunidad de celulosa sintasa. B) Modelo del ensamblaje de una subunidad haxamérica de la roseta mediante la formación de homodímeros y heterodímeros de tres subunidades distintas de CESA. C) Modelo de cristalización de cadenas lineales de  $\beta(1,4)$ -glucano en microfibrillas de celulosa gracias a la oligomerización de moléculas de CESA en rosetas. Adaptado de (Cosgrove, 2005)



el número exacto y la estequiometría de CesAs implicadas en la síntesis de la pared primaria y secundaria de los complejos celulosa sintasa todavía se desconoce. Por otra parte, las rosetas parecen solo representar una pequeña parte del complejo celulosa sintasa, ya que cada complejo a su vez está asociado con un dominio citoplasmático hexagonal de 45-50 nm, desconociéndose todavía sus componentes (Endler & Persson, 2011).

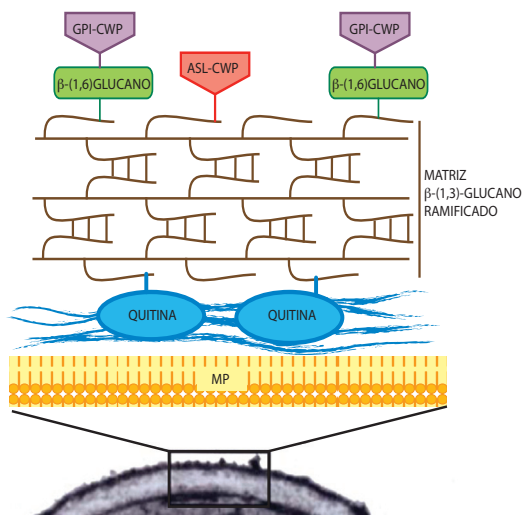
CesA1, CesA3 y CesA6 forman parte del complejo celulosa sintasa que sintetiza la pared primaria. Estas tres proteínas interactúan entre sí, aunque algunos pares complementarios parecen dar interacciones más fuertes, infiriéndose la existencia de homodímeros y heterodímeros. Además, se han purificado y resuelto en geles en condiciones nativas complejos de 840 kDa que se supone se corresponden con una de las seis subunidades de las que constan las rosetas (Carpita, 2011). Un modelo similar se ha propuesto para el complejo responsable de la síntesis de la pared secundaria. En este caso CesA4, CesA7 y CesA8 interactúan entre sí, pero solo CesA4 es capaz de homodimerizar, sugiriendo que CesA4 uniría las distintas subunidades en la estructura de roseta. Se han resuelto complejos de 750 kDa, 460 kDa y 230kDa que se corresponderían supuestamente con hexámeros, tetrámeros y dímeros, respectivamente. Las primeras etapas del ensamblaje de los complejos implica la formación de dímeros y se requiere que las tres subunidades, CesA4, CesA7 y CesA8, estén presentes para que se produzca el siguiente estado de oligomerización. La unión entre las subunidades CesA está mediada por enlaces disulfuro junto con uniones no covalentes muy estables (Atanassov et al., 2009). Algunos datos indican que la dimerización entre subunidades podría producirse por el extremo N-terminal a través de dos dedos de zinc putativos .

### 3.2.3. Composición y estructura de la pared celular de *S. cerevisiae*

Representa, dependiendo de las condiciones de crecimiento, aproximadamente el 10-25% del peso seco de la célula y ocupa el 25-50% del volumen de la misma. Los componentes fundamentales son polisacáridos ( $\approx 85\%$ ) y proteínas ( $\approx 15\%$ ). Los cuatro tipos de macromoléculas que constituyen la PC son:

- Manoproteínas: 30-50%
- $\beta(1,3)$ -Glucano: 30-45%
- $\beta(1,6)$ -Glucano: 5-10%
- Quitina: 1,5-6%

Observada mediante microscopía electrónica la PC muestra dos capas concéntricas . La capa yuxtapuesta a la MP tiene un aspecto fibrilar y está compuesta por  $\beta(1,3)$ - glucano y quitina.



**Figura 4. Modelo molecular de la organización de la PC de *S. cerevisiae*.** La capa interna constituye el esqueleto de la PC y está formada por un entramado de fibras de  $\beta(1,3)$ -glucano ramificadas unidas entre sí por puentes de hidrógeno. En los extremos no reductores de las cadenas laterales del  $\beta(1,3)$ -glucano se ancla el  $\beta(1,6)$ -glucano hacia el exterior y las fibras de quitina hacia el interior, en la zona más próxima a la membrana plasmática (MP). Las manoproteínas se unen covalentemente al  $\beta(1,3)$ - glucano directamente a sus extremos reductores (ASL- CWP) o indirectamente a través de los extremos no reductores del  $\beta(1,6)$ -glucano (GPI-CWP). Adaptado de (Smits et al., 2001).

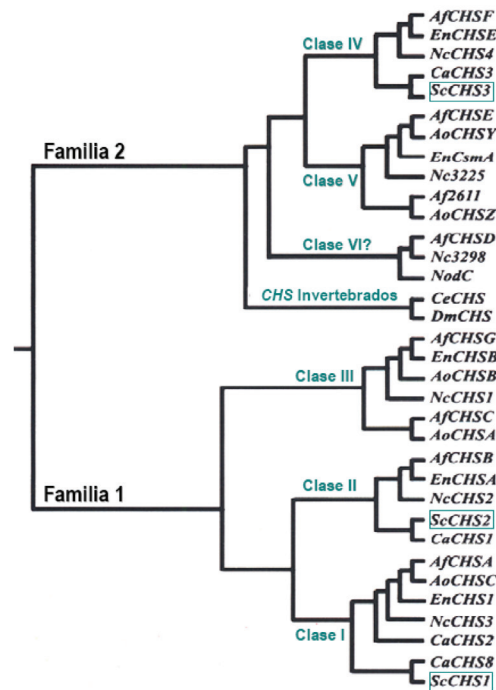
Esta capa sirve de anclaje a la capa externa constituida por manoproteínas, más densa a los electrones y de aspecto amorfo (**Figura 4**). El grueso de la PC lo constituye el  $\beta(1,3)$ -glucano, que es sintetizado por la  $\beta$ -glucán sintasa Fks1. Este compuesto se encuentra moderadamente ramificado y forma una red tridimensional elástica que se mantiene unida entre sí por puentes de hidrógeno con las cadenas laterales. A este entramado se unen covalentemente la quitina hacia el interior y el  $\beta(1,6)$ -glucano hacia el exterior. La quitina, al unirse al  $\beta(1,3)$ -glucano, modifica las propiedades de éste impidiendo su remodelado, actuando por tanto como andamiaje para reforzar la PC (Cabib et al., 2012). El  $\beta(1,6)$ -glucano se encuentra altamente ramificado y a través de sus extremos no reductores sirve de intermediario para el anclaje de las manoproteínas ancladas a glucosil-fosfatidil-inositol (GPI-CWP). Además existen otras manoproteínas, las ASL-CWP (Alkali-Sensitive Linkage Cell Wall Proteins) que se unen covalentemente de forma directa a los extremos no reductores del  $\beta(1,3)$ -glucano (Klis et al., 2006).

## 4. SÍNTESIS DE QUITINA

### 4.1. Quitín sintasas fúngicas

Las quitín sintasas (QS) son las enzimas responsables de la síntesis de quitina. Son proteínas integrales de membrana que extruyen al espacio periplásmico cadenas lineales de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosamina, sintetizadas a partir del sustrato UDP-N-acetilglucosamina. Las quitín sintasas fueron descritas inicialmente en *S. cerevisiae* (Bulawa et al., 1986), trabajo pionero que permitió definir en la siguiente década la compleja familia de las QS fúngicas. En *S. cerevisiae* se han identificado tres actividades QS (QSI, QSII y QSIII), cuyas subunidades catalíticas son codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS3* respectivamente. Todos ellos codifican para proteínas integrales de membrana con un perfil hidropático similar, con entre 6 y 7 dominios transmembrana cada una (Silverman, 1989; Valdivieso et al., 1991).

Usando la proteína Chs2 como modelo, Nagahashi y colaboradores encontraron tres motivos conservados en todas las quitín sintasas descritas hasta ese momento. Las secuencias consenso de estos motivos eran: QXXEY, EDRXL y QXRRW (Nagahashi et al., 1995), considerándose este último el dominio catalítico conservado a lo largo de toda la evolución. El alineamiento de 48 secuencias de quitín sintasas de varios hongos amplió ligeramente el tamaño de estas secuencias consenso y reveló que se incluían dentro de una región con una estructura secun-



**Figura 5. Familias y Clases de QS.** Dendrograma de semejanzas por el método de agrupamiento neighbour-joining de diversas proteínas QS tras un análisis de tipo Clustal W. El árbol se ha construido a partir de la comparación de los dominios catalíticos conservados en todas las QS de hongos. En azul se encuadran los genes *CHS* que codifican para las subunidades catalíticas de las diferentes actividades QS en *S. cerevisiae*. *Sc S. cerevisiae*, *Ca Candida albicans*, *Ao A. oryzae*, *Ce Caenorhabditis elegans*, *Dm Drosophila melanogaster*, *En Emericella nidulans*, *Af Aspergillus fumigatus*, *Nc Neurospora crassa*, *NodC* procede de la bacteria *Sinorhizobium melitoli*. Esquema adaptado de (Valdivieso et al., 2004).

daria conservada de aproximadamente 250 aminoácidos. Comparando las secuencias proteicas con la localización de los motivos conservados, las quitín sintasas se pueden clasificar en dos grandes familias (**Figura 5**). En la Familia 1 los motivos conservados se encuentran aproximadamente en la mitad de la proteína, mientras que la Familia 2 los presenta más próximos al extremo carboxilo-terminal (Ruiz-Herrera & Xoconostle-Cazares, 1995). Dentro de la Familia 1 se encuentran las clases I y II, a las que pertenecen *CHS1* y *CHS2* respectivamente, y la clase III que es exclusiva de hongos filamentosos. La Familia 2 comprende otras tres clases: IV, V y VI. *CHS3* se encuentra dentro de la Clase IV mientras que el resto de clases son exclusivas de hongos filamentosos. Si nos fijamos únicamente en los motivos conservados, Chs1 comparte un 58% de identidad con Chs2, y ambas, alrededor del 30% con Chs3 (Lesage & Bussey, 2006). Estas diferencias no se restringen únicamente al grado de similitud, sino que abarcan también aspectos funcionales de las proteínas (Roncero, 2002).

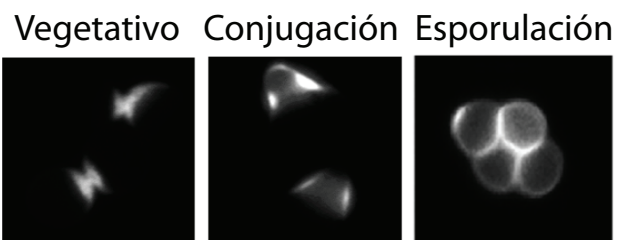
Una importante conclusión que podemos extraer de esta clasificación es que existe un origen común para todas la quitín sintasas directamente relacionado con la Familia 2, y que diversas duplicaciones génicas a lo largo de la evolución han dado lugar a la diversidad actual (Roncero, 2002).

#### **4.2. Localización y función de las quitín sintasas de *S. cerevisiae***

La principal función de la quitina durante el crecimiento vegetativo de levaduras es participar en la división celular. Aunque aproximadamente un 10% de la quitina se encuentra distribuida por la pared lateral de la célula, el extenso porcentaje restante se deposita en el cuello y septo (**Figura 6**). Por ello, como se detalla a continuación, la deposición de quitina está regulada en coordinación con la progresión del ciclo celular.

El establecimiento de la polaridad celular por Cdc42 determina que la maquinaria de polarización dirija la secreción hacia la zona donde va a emerger la célula hija y va a coordinar el ensamblaje del anillo de septinas (**Figura 7A**), [revisado en (Bi & Park, 2012)]. Las septinas constituyen el andamiaje al cual se van a unir los factores de citoquinesis. Esta estructura, además, adapta su conformación a lo largo del ciclo. Al final de G1 las septinas se localizan en la base de la yema incipiente en forma de anillo cortical. Según la yema va emergiendo, el anillo se reorganiza en una estructura en forma de reloj de arena que se mantiene hasta que empieza la citoquinesis, momento en el cual se escinde en dos anillos paralelos que van a flanquear la zona de división del cuello (**Figura 7C**) (Oh & Bi, 2011).

Es el establecimiento del anillo de septinas al final de la fase G1 lo que va a determinar que el complejo QSIII se localice en el cuello, coincidiendo en el tiempo la aparición de ambos complejos. Esta localización es mediada por Bni4 que actúa de intermediario entre el complejo QSIII y el anillo de septinas (DeMarini et al., 1997; Kozubowski et al., 2003). Desde este momento, y hasta que finalice la fase S, la actividad QSIII va a promover la síntesis de un anillo de quitina que va a rodear el cuello y que va a servir de estructura de reforzamiento y andamiaje para el ensamblaje de otros componentes del septo. Este anillo de quitina se corresponde con el 90% de la quitina celular (**Figura 7C y 7D**) (Roncero & Sánchez, 2010).



**Figura 6. Localización de la quitina mediante tinción con calcoflúor.** La localización de la quitina varía en las diferentes etapas del ciclo de vida. En el ciclo mitótico la quitina se localiza principalmente en la zona del septo, en conjugación su deposición está restringida a la base de la proyección y en las ascosporas el quitosán presenta una distribución uniforme.

En la fase G2, Chs3 se endocita, pasando a residir en unas vesículas internas denominadas quitosomas (Chuang & Schekman, 1996; Ziman et al., 1996). Cuando se produce la mitosis y la segregación nuclear, tiene lugar la citoquinesis. Este proceso implica la acción concertada de tres procesos: la contracción del anillo de actomiosina (CAR), deposición de nueva membrana y la formación de un disco de quitina que va a constituir el septo primario (SP). El CAR está constituido por la miosina de tipo 2, Myo1, y por actina; y su reclutamiento va acompañado de la escisión del anillo de septinas. Esto determina que la maquinaria de citoquinesis quede confinada en la región comprendida entre estos dos anillos, de manera que las septinas actúan de barrera de difusión restringiendo el desplazamiento lateral de los factores de citoquinesis (Dobbelaere & Barral, 2004). Por otra parte, estudios recientes indican que la barrera de difusión constituida por las septinas es prescindible para que se produzca correctamente la citoquinesis (Wloka et al., 2011).

El segundo factor necesario para la separación celular es la deposición de nueva membrana, de manera que se produce un cambio en el patrón de secreción de vesículas desde la yema hacia el cuello. Se ha propuesto que es Myo1 quien guía la deposición de las vesículas sobre el anillo de contracción, favoreciendo una distribución más homogénea de las mismas alrededor del anillo de actina (Fang et al., 2010) (Figura 7A).

El tercer suceso es la síntesis del SP. Para que tenga lugar, Chs2 se libera del retículo endoplasmático (ER), donde está retenida, se transporta a lo largo de la ruta de secreción y se transloca en la MP (Chuang & Schekman, 1996; Teh et al., 2009; VerPlank & Li, 2005). Una vez en el cuello, Chs2 se acopla funcionalmente al CAR, de tal manera que la contracción del anillo y la síntesis de quitina son procesos interdependientes (Figura 7B, 7C y 7D). La contracción del anillo produce una invaginación en la MP sobre la cual Chs2 deposita el disco de quitina que da

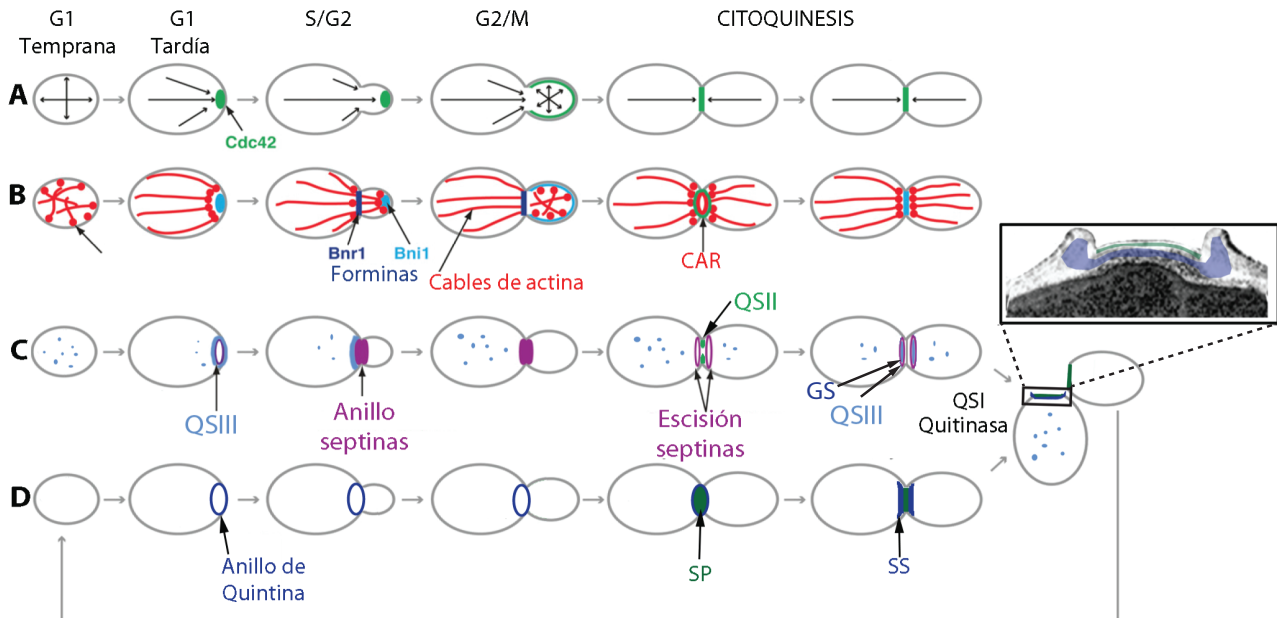


Figura 7. Localización de las actividades QS y quitina en relación con la progresión del ciclo celular. A) Localización de la maquinaria de polarización. Las flechas señalan la dirección del crecimiento celular. B) Organización del citoesqueleto de actina. Los cables de actina nucleados por las forminas Bnr1 y Bni1 guían la exocitosis polarizada. El anillo contráctil de actomiosina (CAR) guía la invaginación de la membrana. C) Organización de las septinas y reclutamiento temporal de las tres actividades QS y la actividad GS en el cuello. D) Deposición de quitina a lo largo del ciclo. Síntesis de un anillo de quitina por la QSIII que refuerza la región del cuello. Separación física de las dos células hijas por el septo primario (SP) constituido por la quitina sintetizada por la QSII. Síntesis del septo secundario (SS), formado por glucano y la quitina sintetizada por la QSIII. Adaptado de (Bi and Park, 2012)

lugar al SP (Bi & Park, 2012). Finalmente el anillo de actomiosina acaba desensamblándose, las membranas plasmáticas se fusionan, y se concluye así la citoquinesis.

En ese momento, Chs2 es endocitada y degradada (Schmidt et al., 2002), mientras que Chs3 vuelve a ser transportada a la MP (Kozubowski et al., 2003) y junto con la actividad glucán sintasa (GS) va a depositar a ambos lados del SP nuevo material de pared para dar lugar al septo secundario (SS), formando una estructura trilaminar visible al microscopio electrónico (Roncero & Sánchez, 2010). Actualmente se desconoce exactamente la secuencia de eventos que conducen a los cambios en la localización de Chs3.

Finalmente es la quitinasa, junto con otras enzimas hidrolíticas secretadas desde la yema, las responsables de la separación celular (Roncero & Sánchez, 2010). Esta separación asimétrica hace que prácticamente toda la quitina del septo quede en la célula madre formando la denominada cicatriz de gemación. La última de las actividades QS en actuar es Chs1, cuya función es contrarrestar la excesiva actividad de la quitinasa durante el proceso de citoquinesis (Roncero & Sánchez, 2010). Al igual que Chs3, Chs1 también se almacena en los quitosomas, desde los cuales se transloca a la MP mediante un mecanismo de transporte desconocido e independiente de Chs3 (Ziman et al., 1998).

La célula hija, ya como célula individual, debe iniciar un proceso de maduración determinado por el crecimiento celular y la remodelación de la pared. Es a partir de este momento cuando la quitina se empieza a localizar por toda su pared lateral (Cabib et al., 2001; Cabib et al., 1996), sin que se conozca exactamente cómo.

En el proceso de conjugación, la cantidad de quitina se triplica y se localiza específicamente en la base de la proyección (**Figura 6**). Durante la formación de las ascosporas, la quitina es desacetilada por la acción de dos desacetilasas específicas para dar lugar al quitosán. El quitosán forma un complejo con la capa de ditirosina, que es la responsable de la resistencia de la ascosporas a condiciones ambientales adversas (Cid et al., 1995).

### **4.3. Síntesis de quitina en otros hongos**

En el reino Fungi el número de genes *CHS* puede variar desde uno solo (clase III *Encephalitozoon cuniculi*) hasta más de 10 en hongos filamentosos, comprendiendo todas las clases descritas. Las clases III, V, VI y VII son específicas de hongos filamentosos, lo que sugiere que estas enzimas juegan un papel en el desarrollo de las hifas. *S. cerevisiae* es con diferencia el organismo en el que mejor se conoce la función de los distintos genes *CHS*. En *Candida albicans* el proceso parece bastante similar a *S. cerevisiae*. Posee dos quitín sintasas de clase I, *CaCHS2* y *CaCHS8*; una quitín sintasa de clase II, *CaCHS1* y; y una quitín sintasa de clase IV, *CaCHS3*. Distintos trabajos sugieren que la función y mecanismos de regulación de las distintas QS de *C. albicans* están bastante conservados con los de *S. cerevisiae* (Lenardon et al., 2007).

Sin embargo, el estudio de la quitina en hongos filamentosos es bastante más complicado debido a la gran redundancia de genes *CHS* y por la dificultad para deletarlos conjuntamente. Los hongos filamentosos tienen una isoenzima QS de la Familia I, directamente implicada en el mantenimiento de la integridad de la PC durante la citoquinesis; esta situación sería similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*, donde este rol es desempeñado por la clase II. En cuanto a los miembros de la Familia 2 la función no es tan clara. En algunos Basidiomicetos, como *Ustilago* o *Cryptococcus*, la síntesis de la mayor parte de la quitina recae sobre la quitín sintasa de clase IV (Banks et al., 2005; Weber et al., 2006), siendo esta síntesis dependiente también de Chs4 (Banks et al., 2005). Sin embargo, el papel de la clase IV en Ascomicetos filamentosos es desconocida ya que todos los mutantes estudiados hasta el momento carecen de fenotipo (Motoyama et al., 1997; Specht et al., 1996). La clase V, por su parte, se requiere para la correcta morfogénesis celular en todos los hongos filamentosos estudiados (Horiuchi et al., 1999; Madrid et al.,

2003; Motoyama et al., 1997; Specht et al., 1996), aunque no existen evidencias que relacionen directamente estas proteínas con la capacidad para sintetizar quitina o actividad enzimática. Un estudio reciente indica que la clase V de *Aspergillus fumigatus* sería responsable de la síntesis de la quitina durante el proceso de conidiogénesis (Jiménez-Ortigosa et al., 2012).

Las enzimas de clase V constan del dominio QS conservado en la Familia II flanqueado por hélices transmembrana, pero además contienen un dominio motor parecido a miosina o MMD (Myosin motor-like) en su región N-terminal. Es por ello que a estas enzimas también se las ha clasificado dentro de las miosinas, más en concreto se las ha denominado miosinas de clase 17. El dominio MMD es esencial para la virulencia del hongo y su capacidad para interactuar con actina sugiere que tiene alguna función en la localización de la enzima (Steinberg, 2011). En el caso de *Ustilago maydis* se ha visto que el transporte de la QS de clase V, Mcs1, depende tanto de filamentos de actina como de microtúbulos. Sorprendentemente, la motilidad de la enzima es independiente del dominio MMD. Se ha propuesto que el transporte anterógrado en vesículas mediado por las proteínas motoras miosina-5 y kinesina-1 se opondría al transporte retrógrado promovido por la dineína. Este sistema constituye por tanto un transporte bidireccional que permite a la enzima fácilmente alcanzar la región donde ha de secretarse. Una vez ha alcanzado este punto, actuaría el dominio MMD de la QS favoreciendo su secreción en dicha región de la hifa (Schuster et al., 2011).

#### **4.4. Función y regulación de la actividad QSIII**

Como se ha comentado anteriormente, la QSIII es la responsable de la síntesis del anillo de quitina formado en el cuello durante la división celular y que supone aproximadamente entre el 85-90% del total de la quitina en levaduras. Sorprendentemente el mutante *chs3Δ*, que carece de esta actividad y por tanto del anillo de quitina, es totalmente viable, cuestionando la importancia fisiológica de este anillo. Resultados muy posteriores han permitido elaborar el mapa de la letalidad sintética para el mutante *chs3Δ*, demostrándose que la falta de la QSIII compromete la viabilidad celular en múltiples circunstancias, lo que indicaría un papel crítico del anillo de quitina ante cualquier alteración del proceso de citoquinesis (Lesage et al., 2005). Esta evidencia está de acuerdo con el incremento en quitina promovido por la activación de la ruta PKC (Levin, 2005) o con la síntesis de un septo de remediación funcional en el mutante *chs2Δ* (Cabib & Schmidt, 2003), ambos directamente dependiente de la actividad QSIII.

¿Como se regula esta actividad? El trabajo de múltiples grupos no ha permitido establecer un patrón claro de regulación transcripcional de *CHS3*. Además, los niveles celulares de *Chs3* son muy constantes y asociados a una vida media muy larga (>3h) de la proteína (Ziman et al., 1996). Si a esto le añadimos que la sobreexpresión de *CHS3* no produce incrementos significativos en la síntesis de quitina debemos pensar en un tipo de regulación de la QSIII eminentemente postraduccional. Este modelo estaría de acuerdo con las múltiples modificaciones postraducionales descritas para *Chs3* en ensayos masivos, aunque se desconoce el papel de las mismas (<http://www.uniprot.org/uniprot/P29465>).

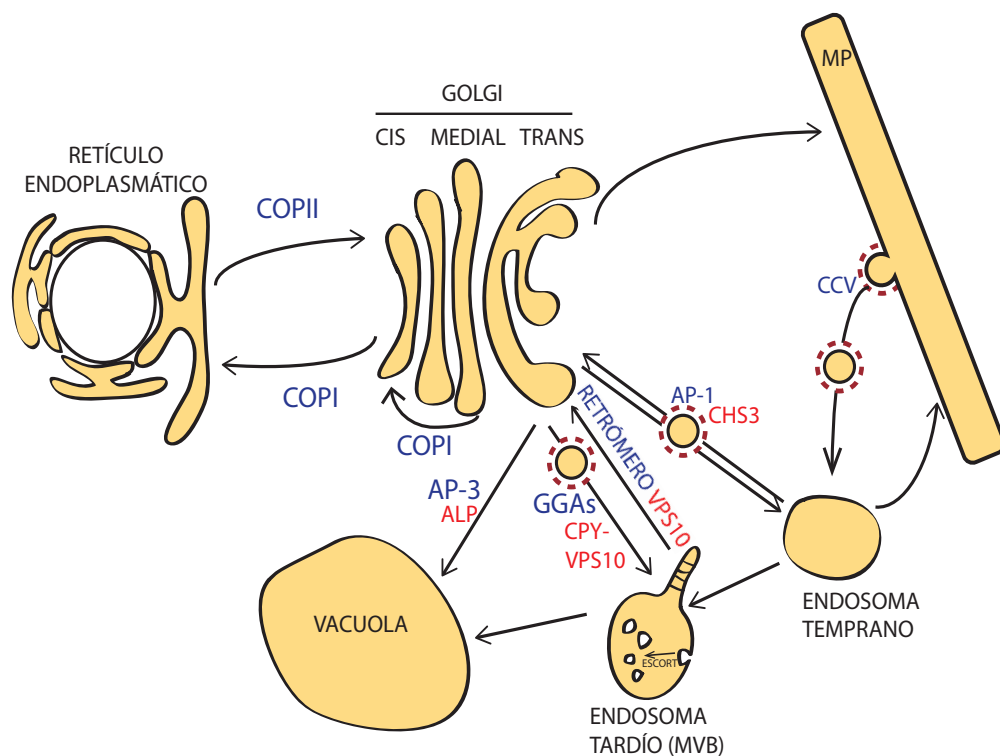
*Chs3* es una proteína de 130 KDa con varios dominios transmembrana y glicosilada (Cos et al., 1998). Por lo tanto, es una proteína cuya síntesis tiene lugar en el RE y que va a entrar en la ruta de secreción. *Chs3* ejerce su función en la MP, aunque la cantidad total de *Chs3* que reside en la misma es baja, ya que entre el 50-70% de *Chs3* se localiza en un conjunto de vesículas internas denominadas históricamente como quitosomas (Ziman et al., 1996). Como se ha comentado en el apartado 4.2., la localización de *Chs3* en la MP está íntimamente relacionada con la progresión del ciclo celular. Resumidamente, la encontramos en el cuello de yemas pequeñas y grandes, estando ausente del cuello de yemas medianas, donde se encuentra mayoritariamente en los quitosomas (**Figura 7C**). Además, la respuesta a alteraciones de la PC induce una redistribución de *Chs3* desde los compartimentos internos hacia la MP (Valdivia, 2003), incrementándose la deposición de quitina hasta 20 veces (García-Rodríguez et al., 2000; Valdivieso et al., 2000).

La selección y caracterización de mutantes resistentes a calcoflúor [ver [Roncero, 2002](#) para una visión histórica] permitió determinar que esta regulación tan compleja es dependiente de una serie de factores que van a escoltar a Chs3 en su tránsito desde el RE hasta la MP. Algunos de estos factores son las proteínas Chs4, Chs5, Chs6 y Chs7, que se unen a la maquinaria general de la ruta de secreción y endocitosis necesaria para el tráfico intracelular de Chs3. Por tanto, el transporte intracelular de Chs3, coordinado e integrado dentro de la ruta de secreción general, es el elemento clave para la regulación de la actividad QSIII. De esta forma, se consigue una síntesis de quitina espacial y temporalmente restringida, esencial para la viabilidad de la célula fúngica. Dada la importancia del tráfico intracelular en la regulación de Chs3, la segunda mitad de esta introducción se va a centrar en describir de manera general la ruta de secreción y endocitosis en *S. cerevisiae*.

## 5. VISIÓN GENERAL DEL TRÁFICO INTRACELULAR DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS TRANSMEMBRANA

### 5.1. Proteínas con dominios transmembrana

Aproximadamente del 20-30% de las proteínas del proteoma celular lo constituyen proteínas transmembrana ([Shao & Hegde, 2011](#)). La clasificación más simple de las proteínas transmembrana establece que las proteínas transmembranales de tipo I son aquellas que tienen el extremo N-terminal orientado hacia el lumen del RE y de tipo II si está orientado hacia el citoplasma. Por otra parte, las proteínas que atraviesan varias veces la membrana se las denomina politópicas. Otra clase de proteínas de membrana son aquellas que se insertan en las membranas por anclajes lipídicos unidos covalentemente a la proteína y que no necesariamente poseen segmentos transmembrana ([Shao & Hegde, 2011](#)).



**Figura 8. Esquema general de las rutas de tráfico intracelular de proteínas de membrana.** En azul se marcan las cubiertas y adaptadores que median las interconexiones indicadas con las flechas. En rojo se marcan algunos ejemplos representativos de proteínas de membrana usadas como modelo del tráfico intracelular. CCV indica vesículas recubiertas de clatrina.

Todas las proteínas de secreción se insertan primero en el retículo endoplasmático (RE) donde tiene lugar un estricto régimen de plegamiento y ensamblaje. A continuación son transportadas al Golgi donde se produce su distribución hacia otros destinos, como la membrana plasmática (MP), los endosomas o la vacuola (**Figura 8**). Muchas proteínas politópicas se localizan en la MP donde ejercen importantes funciones, por ejemplo receptores, transportadores o las propias enzimas que sintetizan la PC. La localización correcta de estas proteína en la superficie celular se controla a nivel del *trans*-Golgi Network (TGN) y endosomas, donde muchos eventos de transporte intracelular tienen lugar en respuesta a distintos estímulos. De esta manera, los compartimentos secretores y endocíticos actúan en concierto para conseguir una estrecha regulación de las proteínas que han de expresarse en MP.

En el contexto que nos ocupa, la regulación de la localización en la superficie celular de las proteínas que sintetizan la PC es esencial a lo largo del ciclo de división de *S. cerevisiae*. A continuación se va a desarrollar una visión general del tráfico vesicular y de los componentes generales implicados en él, para después profundizar en los mecanismos específicos del transporte de la QSIII.

## **5.2. Teoría del transporte vesicular**

George Palade estableció en 1975 las bases del tráfico intracelular (Palade, 1975). Esta teoría propone que el transporte de proteínas entre orgánulos se produce a través de vesículas, que geman desde un compartimento de membrana donador y son transportadas hacia un compartimento receptor.

De manera simplificada la vida de una vesícula se puede resumir en los siguientes pasos: concentración de los cargos, gemación de la vesícula, transporte de la misma a través del citoesqueleto, y finalmente reconocimiento por el compartimento receptor y fusión con el mismo (**Figura 9**). En cada uno de estos pasos actúan coordinadamente una serie de familias de proteínas con funciones específicas. A continuación se resumen las distintas familias de factores que intervienen en la ruta de secreción:

- GTPasas reguladoras del tráfico vesicular: El transporte dirigido requiere que las membranas donadoras y receptoras tengan una identidad propia. Esta identidad es definida por la concentración específica de determinados tipos de lípidos en conjunción con la acción de GTPasas pequeñas (o proteínas G) de la superfamilia Ras, que son las responsables de coordinar todo el tráfico intracelular. Las proteínas G alternan entre dos conformaciones distintas, una activa cuando se encuentran unidas a GTP y otra forma inactiva, unida a GDP. La transición entre estos dos estados es inducida por dos tipos de factores, los denominados GEFs (Guanine nucleotide Exchange Factors) que facilitan el intercambio del GDP por GTP, y los factores GAP (GTPase-Activating Proteins) que promueven la hidrólisis del GTP a GDP. En su conformación activa, estas GTPasas van a reclutar a sus proteínas efectoras, que van a promover procesos tales como la formación de cubiertas o fusión de membranas.

Las GTPasas que regulan el tráfico intracelular son las GTPasas de las familias Rab, Arf y Rho:

- a) GTPasas de la familia Rab (Ras-related in brain): son los principales reguladores del tráfico intracelular y actúan coordinando rutas específicas. El genoma de *S. cerevisiae* codifica para 11 Rab GTPasas, la mayoría de ellas denominadas Ypt. Un ejemplo es Ypt1 que recluta los efectores necesarios para que se produzca la fusión de las vesículas derivadas del RE con el Golgi. Es frecuente la existencia de cascadas de activación de Rab GTPasas, donde el reclutamiento de la primera y las modificaciones que ésta ejerce a través de sus efectores, permite la unión y activación de la siguiente Rab. De

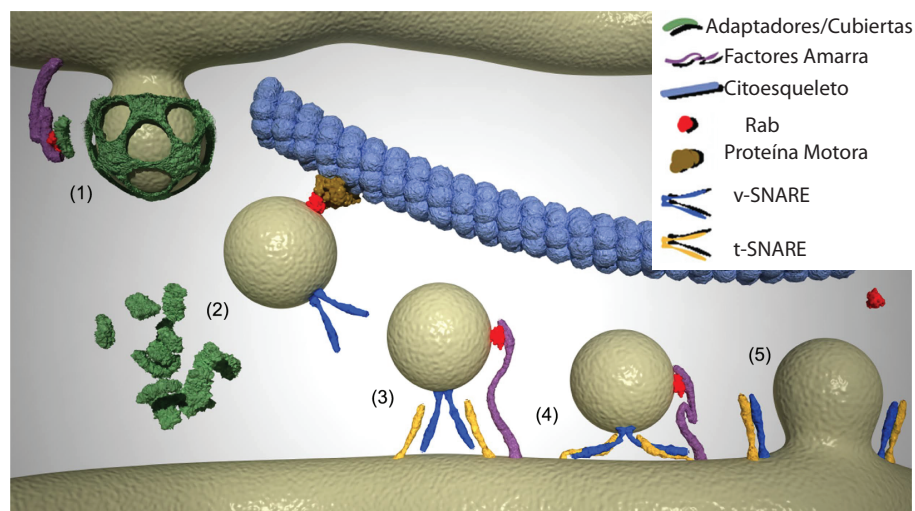


esta manera se regula la sucesión de los distintos pasos en la maduración de la vesícula (Segev, 2001).

b) GTPasas de la familia Arf (ADP-Ribosylation Factor): también reclutan distintos efectores que participan en el tráfico vesicular, entre los que cabe destacar las cubiertas. Por ejemplo la Arf Sar1 es responsable del reclutamiento de la cubierta COPII, mientras que Arf1 recluta a COPI y clatrina (Gillingham & Munro, 2007).

c) GTPasas de la familia Rho (Ras HOmolog): Entre otras funciones, son importantes en el establecimiento de la polaridad celular y regulación del citoesqueleto de actina. Por ejemplo, Cdc42 es el principal responsable del establecimiento polaridad celular mediante la organización del citoesqueleto de actina, el ensamblaje del anillo de septinas y permitiendo que la secreción ocurra de manera polarizada (Perez & Rincón, 2010).

- Cubiertas proteicas y adaptadores: Median la gemación de la vesícula, que a su vez está acoplada con la selección de los cargos que han de incorporarse en la vesícula. Aunque algunas proteínas transmembrana poseen las secuencias necesarias para interactuar directamente con las cubiertas, es frecuente que la interacción esté mediada por proteínas adaptadoras que son las responsables de la especificidad del proceso de selección (Bonifacio, 2004a).
- Citoesqueleto y proteínas motoras: La vesícula a continuación se dirige al compartimento receptor remolcadas por proteínas motoras que se desplazan a través de las vías de transporte que constituyen los elementos del citoesqueleto, tanto cables de actina como microtúbulos. Las proteínas motoras que se mueven sobre los cables de actina son las miosinas, mientras que las dineínas y quinesinas se desplazan sobre los microtúbulos (Anitei & Hoflack, 2011).
- Factores “amarras” (Tethering factors) y SNAREs: El último paso en la vida de la vesícula es la fusión con el compartimento receptor. Este proceso es complejo en dos sentidos, por una parte requiere de selectividad por parte del compartimento receptor, y por otra requiere de una maquinaria específica que favorezca un proceso termodinámicamente desfavorable como es la fusión de membranas. En el compartimento receptor residen



**Figura 9. Formación, transporte y fusión de una vesícula.** La cubierta promueve la concentración de los cargos y la deformación de la membrana para dar lugar a la vesícula (1). A continuación la vesícula es transportada a lo largo de los cables del citoesqueleto hasta que alcanza las cercanías del compartimento receptor (2). Los factores amarra reconocen la vesícula (3) y establecen un puente para permitir la fusión de la vesícula con la membrana receptora gracias a la acción de los pares de SNAREs (4 y 5). Adaptado de (Vazquez-Martinez & Malagon, 2011)

unos complejos denominados complejos amarra (o "Tethering factors"). Estos complejos forman un puente entre la vesícula y la membrana de manera que son los responsables del reconocimiento inicial de la vesícula. Los factores amarra son reclutados por las GTPasas Rab y además son capaces de concentrar a SNAREs, que son los factores que median la fusión de la vesícula. Existen dos tipos de factores amarra: Proteínas largas con hélices superenrolladas (motivos "coiled-coil"), y complejos amarra con múltiples subunidades (Multisubunit Tethering Complexes o MTCs), con hasta más de 10 subunidades. Los MTCs a su vez pueden dividirse en dos grupos generales: aquellos que son requeridos para la fusión de membranas con orgánulos de la ruta de secreción, por ejemplo, Dsl1, COG, GARP y el exocisto, y que recientemente se han renombrado como CATCHR (Complexes Associated with Tethering Containing Helical Rods); y aquellos que actúan en la ruta endosomal (CORVET y HOPS). Además, los eucariotas tienen el complejo TRAPP (TRANsport Protein Particle), un GEF multimérico que no encaja en ninguna de las dos categorías anteriores, pero que combina el reconocimiento de la cubierta con el amarre de la vesícula [revisado en (Bröcker et al., 2010; Yu & Hughson, 2010)].

Por último, la vesícula en las cercanías de la membrana se fusiona con ella por la acción de pares de proteínas transmembranales denominadas SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors). Hay dos tipos: v-SNAREs y t-SNAREs. Las v-SNAREs se incorporan en la vesícula durante su formación en el compartimento donador y las t-SNAREs se encuentran en las membranas del compartimento diana. La interacción entre v-SNARE y t-SNARE provoca un acercamiento de las dos membranas, liberando además la energía necesaria para promover su fusión. Los complejos de SNAREs formados a continuación son disociados por la acción de AAA ATPasas NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor) y sus proteínas adaptadoras SNAPS (Soluble NSF attachment protein). Las SNAREs quedan por tanto disponibles para mediar un nuevo evento de fusión (Risselada & Grubmüller, 2012).

Por tanto, la precisión en el transporte de vesículas depende de: el reconocimiento específico y captura de los cargos mediante la acción de cubiertas; el reconocimiento de la vesícula por factores amarra; y la fusión de membranas mediada por SNAREs. A su vez, la regulación y reclutamiento de todos estos factores es liderada por las GTPasas de la familia Rab, Arf y Rho. Estos mecanismos del transporte vesicular están conservados en todos los eucariotas .

Desde un punto de vista funcional, la secreción puede dividirse en dos etapas, una temprana y otra tardía, que describiremos a continuación.

## **6. RUTA SECRETORA TEMPRANA: RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO**

El punto de partida de la ruta de secreción es el RE. En este orgánulo se produce la inserción y plegamiento de las proteínas transmembranales, y su empaquetamiento en vesículas con dirección hacia la cara *cis* del Golgi. El tráfico entre estos dos orgánulos es bidireccional, siendo el transporte anterógrado dirigido por vesículas con cubierta COPII, mientras que el transporte de vuelta desde el *cis*-Golgi lo llevan a cabo las vesículas de tipo COPI.

### **6.1. Translocación y plegamiento de proteínas transmembranales**

El RE es el principal sitio de traducción y translocación de las proteínas recién sintetizadas en células eucariotas. La translocación de proteínas en el RE puede producirse postraduccionalmente o co-traduccionalmente, siendo este último mecanismo el usado para insertar las proteínas transmembranales. La síntesis de las proteínas de membrana se inicia en los ribosomas citosólicos. El primer segmento hidrofóbico que emerge del ribosoma tras el dominio soluble N-terminal es reconocido por la denominada partícula de reconocimiento de la señal (Signal

Recognition Particle o SRP). La SRP bloquea la traducción y se dirige al RE donde interacciona con su receptor. Este paso determina la transferencia de la proteína nascente al complejo del translocón (o complejo Sec61 en eucariotas), que es el canal acuoso a través del cual se irán insertando los fragmentos transmembrana (Shao & Hegde, 2011).

Las chaperonas ejercen un papel fundamental asistiendo el plegamiento de proteínas en el RE. Su función es impedir interacciones inapropiadas entre las hélices transmembrana hasta que se haya sintetizado la proteína completa. Dentro de las chaperonas se puede distinguir entre las denominadas chaperonas “generalistas” o “públicas”, y las chaperonas “especialistas” o “privadas”. Entre las primeras encontramos por ejemplo a BiP (immunoglobulin binding protein, Kar2 en levaduras) que funciona en los mecanismos de control primario de un amplio rango de proteínas (Brodsky & Skach, 2011). El segundo tipo de chaperonas tiene la característica de ser específicas de un único cliente o número reducido de ellos. El caso mejor caracterizado en levaduras es el de Shr3, que previene la agregación y facilita la exportación de las permeasas de aminoácidos. Entre estas chaperonas específicas de sustrato encontramos también a Pho86, y Chs7, que asisten específicamente en el plegamiento de Pho84 y Chs3, respectivamente (Kota & Ljungdahl, 2005; Kota et al., 2007). Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares por los que estas chaperonas median el plegamiento y exportación de sus cargos.

En el RE además se produce la N-glicosilación de las proteínas. Los organismos eucariotas generalmente poseen una oligosacaril transferasa multiproteica en la cara luminal del RE que cataliza la transferencia de residuos de azúcar sobre una asparagina situada en la secuencia consenso Asn-X-(Ser/Thr). La glicosilación es crucial en la secreción de proteínas ya que influye en el plegamiento de las mismas, actúa como ligando para la unión de chaperonas y contribuye a los mecanismos de control de calidad del RE. Los residuos de azúcar unidos en el RE después son susceptibles de ser procesados en el aparato de Golgi, de tal manera que las estructuras de glicano pueden ser excepcionalmente complejas. Esta gran diversidad de modificaciones glucídicas es la causante de que la alteración de un sitio de glicosilación solo sea evidente en un contexto celular determinado, o incluso pasar totalmente inadvertido en otros contextos (Moremen et al., 2012).

## **6.2. Salida del RE en vesículas COPII**

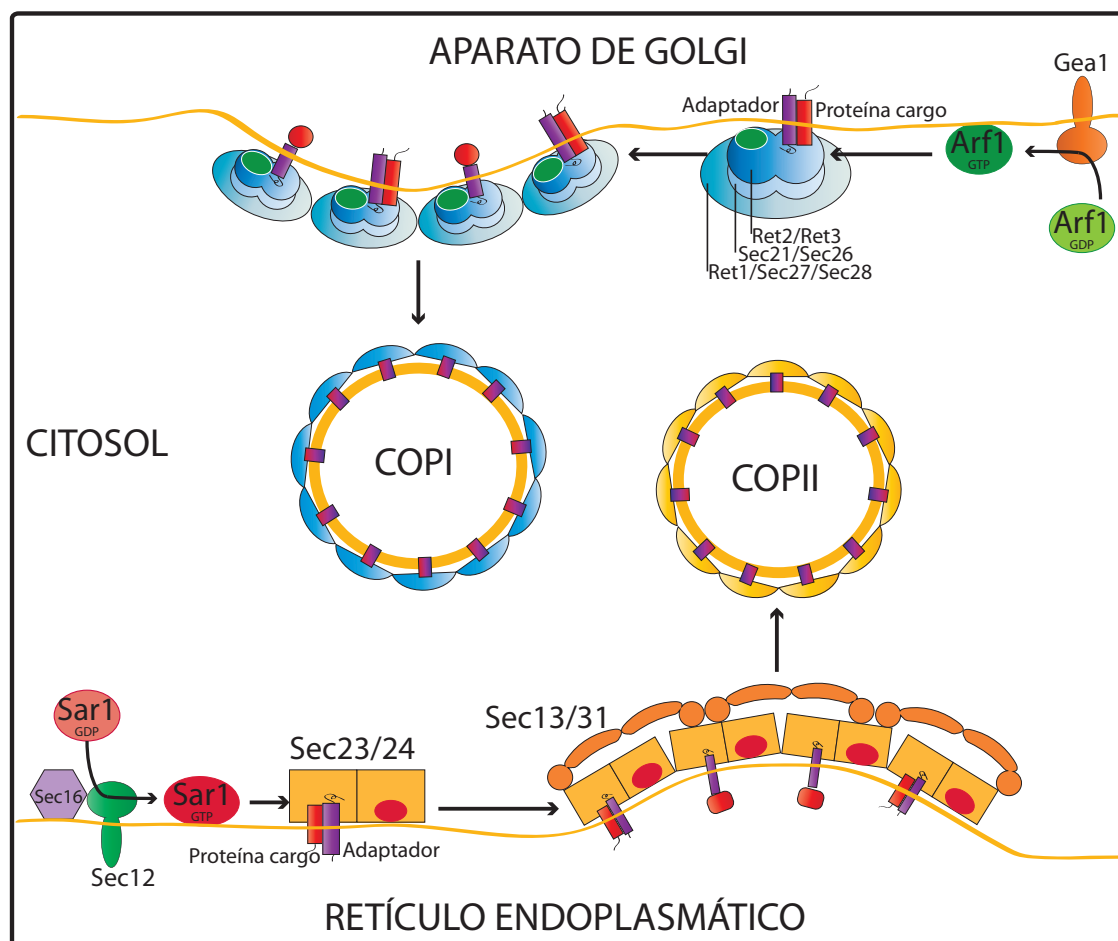
Las proteínas que van a salir del RE se concentran en dominios especializados del RE denominadas ERES (del inglés Endoplasmic Reticulum Exit Sites) o sitios transitorios del RE (tER) (Okamoto et al., 2012; Spang, 2009a). Se ha asignado un papel específico a la proteína Sec16 como la organizadora de los ERES, actuando como una plataforma que estabiliza el ensamblaje de la cubierta mediante su interacción directa con distintos componentes de la misma (Whittle & Schwartz, 2010). La formación de la cubierta en los ERES es liderada por Sar1, una GTPasa de la familia ARF. Sar1, activada por el GEF Sec12, se une a la membrana del RE e inicia el reclutamiento de la cubierta COPII. La cubierta COPII está a su vez constituida por dos subcomplejos. El primero en reclutarse sobre el andamiaje creado por Sec16 es el complejo Sec23-24, un heterodímero que es el responsable de concentrar a los cargos. A continuación se recluta la capa externa de la cubierta COPII, formada por el heterotetrámero Sec13-31 (Jensen & Schekman, 2011) (**Figura 10**). El reconocimiento entre las proteínas cargos y las cubiertas puede ser directo o mediado por receptores. Entre los receptores cabe destacar a la familia de proteínas p24, que actúan como receptores de proteínas ancladas a GPI; Erv29 que actúa en la recepción de cargos solubles como gp $\alpha$ f (glycosylated pro- $\alpha$ -factor) o la carboxipeptidasa Y (CPY); y Erv14, que es el principal receptor de las proteínas transmembranales cuyo destino es la fase final de la vía de secreción [revisado en (Dancourt & Barlowe, 2010)].

### 6.3. Transporte retrógrado en vesículas COPI

El transporte retrógrado hacia el RE es importante para la recuperación de proteínas que actúan escoltando a otras en su transporte desde el RE al Golgi, de manera que ciclan de manera continua entre estos dos orgánulos. De igual forma, gracias a este sistema se pueden recuperar aquellas proteínas residentes en el RE que se han escapado del mismo.

Aunque estructuralmente COPI y COPII son distintas, su ensamblaje inicial es análogo. Su reclutamiento depende de Arf1, actuando los GEFs Gea1 y Gea2 en la activación de la GTPasa. Arf1 activo recluta el complejo heptamérico pre-ensamblado COPI, el cual consta de un complejo externo formado por las subunidades  $\alpha/\beta'/\epsilon$  (Ret1-Sec27-Sec28 de levaduras) y un complejo interno constituido por  $\beta/\gamma/\delta/\zeta$  (Sec26/Sec27/Ret2/Ret3), también conocidos como COP-I-B y COPI-f (Gabrieli et al., 2007; Popoff et al., 2011) (Figura 10).

Las señales de reconocimiento en las proteínas cargo y los receptores son variadas. Por ejemplo, proteínas solubles que muestran motivos KDEL (HDEL en levaduras) son devueltas desde el Golgi por el receptor KDEL o su homólogo Erd2 en levaduras (ER retention defective 2) (Lewis & Pelham, 1992). El retorno de proteínas de membrana se ha visto que es mediado por un motivo dibásico (dilisina o diarginina), que es directamente reconocido por COPI (Teasdale and Jackson, 1996). Las subunidades COPI con dominios de unión a cargo incluyen a Sec27 y Ret1, las cuales se unen a señales dilisina a través de un dominio WD40; y Sec26 y Ret2 que se unen a dominios



**Figura 10. Formación de las vesículas COPI y COPII.** En la parte inferior de la figura se muestran los factores que promueven la formación de los ERES sobre los cuales se ensambla la cubierta COPII. En la parte superior se representa el transporte retrógrado desde el Golgi hacia el RE mediado por vesículas COPI y los factores implicados en dicho transporte. Consultar el texto para más detalles.

diarginina (Duden et al., 1994; Eugster et al., 2004a). También existen receptores implicados en el transporte retrógrado de proteínas de membrana, como por ejemplo el receptor Rer1 que recupera a Sec12, Sec63, Sec71 y Mns1. Rer1 reconoce una serie de residuos polares organizados específicamente en las hélices transmembrana de sus cargos, devolviéndolos al RE en vesículas COPI (Kaether et al., 2007; Sato et al., 2003; Spasic et al., 2007).

#### **6.4. Control de calidad en el RE**

La célula ha desarrollado una serie de mecanismos para hacer frente a la acumulación de proteínas mal plegadas en el interior celular. El mal funcionamiento de estos sistemas de control es la base molecular de ciertas enfermedades como la fibrosis quística, la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson u otras enfermedades causadas por priones (Khurana and Lindquist, 2010).

Aquellas proteínas que tardan en adquirir su conformación final o que tras varias rondas de plegamiento no consiguen alcanzarla, son eliminadas por el denominado ERAD (Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation). El primer paso de este sistema implica el reconocimiento de las especies aberrantes por chaperonas citoplasmáticas, lumbales y factores asociados, como por ejemplo la familia Hsp70 de chaperonas, la calnexina y calreticulina, y la disulfuro isomerasa. La mayoría de los sustratos de ERAD son poliubiquitinados antes de ser degradados por el proteasoma en el citoplasma. La poliubiquitinación en *S. cerevisiae* es llevada a cabo por dos ubiquitín ligasas distintas (Doa10 y Hrd1), y actuará una u otra en función de dónde resida la lesión de la proteína. En este sentido, en *S. cerevisiae* se han descrito tres tipos de ERAD: ERAD-C, ERAD-L y ERAD-M, que se ocuparán de las proteínas con lesiones en el dominio citoplasmático, luminal y transmembrana, respectivamente (Carvalho et al., 2006).

Una vez que la proteína ha sido poliubiquitinada tiene que ser extraída de la membrana hacia el citoplasma. Se ha propuesto que el propio translocón Sec61 es capaz de actuar como el canal que permite la salida de la proteína. La energía necesaria para que se produzca este proceso proviene de la hidrólisis de ATP promovida por la ATPasa Cdc48. A medida que la proteína es retrotranslocada se siguen añadiendo cadenas de poliubiquitina. Finalmente, el proteasoma 26S reconoce las cadenas de poliubiquitina y lleva a cabo la degradación de la proteína en el citoplasma [revisado en (Vembar & Brodsky, 2008)].

Ciertas condiciones de estrés celular conducen al desbordamiento de los sistemas de plegamiento y de degradación de proteínas. Ante la excesiva acumulación de especies mal plegadas, la célula da lugar a la activación de una respuesta adaptativa denominada UPR (Unfolded Protein Response). Esta respuesta busca aliviar el estrés celular básicamente mediante dos mecanismos, por un lado disminuyendo la tasa de síntesis de las proteínas y por otra aumentando la expresión de chaperonas y factores pertenecientes al ERAD. Cuando las condiciones de estrés se prolongan y los mecanismos anteriores fallan, la UPR finalmente desencadena programas terminales como la apoptosis y la autofagia (Brodsky & Skach, 2011).

Además, existen otros mecanismos de control adicionales que dependen del tráfico de proteínas y cuyo objetivo es evitar que proteínas aberrantes escapen del RE ocasionando daños deletéreos en la célula. El primer mecanismo implica la retención activa en el RE (Ellgaard & Helenius, 2003). Por ejemplo, se ha propuesto que la propia maquinaria del ERAD compite con el proceso de exportación favoreciendo la retención de las proteínas aberrantes (Kincaid & Cooper, 2007). Sin embargo, en muchos casos la retención en el RE no es posible, o incluso puede ser la propia UPR la que promueva la salida de proteínas mal plegadas para aliviar la agregación en el RE (Kawaguchi et al., 2010), entonces el aparato de Golgi activa sus propios sistemas de control. Éstos pueden implicar el direccionamiento de las proteínas mal plegadas hacia la vacuola (Coughlan et al., 2004), o el retorno activo de las mismas en vesículas COPI hacia el RE. Por ejemplo, CPY\*, una forma mal plegada de la carboxipeptidasa Y, escapa del RE y es devuelta

al mismo para ser sustrato del ERAD (Kawaguchi et al., 2010). Otro ejemplo es el retorno de proteínas no ensambladas que tienen que abandonar el RE en forma de oligómeros. Varias proteínas transmembrana dependen de Rer1 en este proceso, por ejemplo en la devolución de subunidades no ensambladas del receptor de acetilcolina en humanos (Valkova et al., 2011), o en el retorno de la subunidad Fet3 del complejo transportador de hierro Fet3-Ftr1 en levaduras (Sato et al., 2004).

Por tanto, la retención estática en el RE y el retorno dinámico desde el Golgi son mecanismos coordinados para prevenir que proteínas aberrantes alcancen compartimentos distales de la ruta de secreción. Un ejemplo que aúna ambos mecanismos es la monitorización del remodelado del anclaje GPI en levaduras. El remodelado del anclaje lipídico de las proteínas GPI determina su concentración en dominios discretos del RE que supondrán los futuros ERES, de tal manera que la falta de remodelación del GPI segrega a estas proteínas de los sitios de salida (Castillon et al., 2009). Una vez concentradas en los ERES, el complejo p24 actúa de adaptador mediando la interacción con la cubierta COPII y promoviendo la salida de las proteínas GPI del RE. Además, el complejo p24 en el Golgi tiene la función de mediar el retorno de aquellas moléculas con el anclaje parcialmente remodelado y que se han escapado del RE, lo que les ofrece una nueva oportunidad para madurar completamente su anclaje (Castillon et al., 2011; Fujita & Kinoshita, 2012).

### **6.5. Salida de Chs3 del RE: Chs7 y palmitoilación**

La primera característica específica del transporte de Chs3 es que posee una chaperona dedicada, Chs7. En ausencia de Chs7, Chs3 queda totalmente retenida en el RE debido a la formación de grandes agregados, como resultado de los cuales Chs3 es inactiva (Kota & Ljungdahl, 2005), tanto *in vitro* como *in vivo* (Trilla et al., 1999). Chs7 está en la célula en cantidades limitantes, de manera que la sobreexpresión de *CHS3* se traduce en un aumento de la retención de Chs3 en el RE. La sobreexpresión conjunta de ambas proteínas aumenta los niveles de actividad QSIII, lo que sugiere que la regulación transcripcional de *CHS7* puede ser un mecanismo importante de regulación de la síntesis de quitina *in vivo*. De acuerdo con esto, se ha visto un aumento de la expresión de *CHS7* en determinados procesos biológicos (Trilla et al., 1999).

Además, Chs3 es palmitoilada por la acil-transferasa Pfa4. Esta modificación lipídica también es necesaria para evitar la agregación de Chs3, como consecuencia de la cual se produce su retención parcial en el RE. Se ha propuesto que la palmitoilación asiste en el plegamiento y salida de Chs3, probablemente modificando la inclinación de las hélices transmembrana para adaptar su longitud al grosor de la membrana del RE (Abrami et al., 2008). De esta manera se piensa que Chs7 y la palmitoilación actúan de forma paralela y coordinada para garantizar la exportación de Chs3 del RE (Lam et al., 2006).

## **7. RUTA DE SECRECIÓN TARDÍA**

Una vez que las proteínas han salido del RE, pasan a formar parte un sistema de endomembranas constituido por distintos orgánulos, entre los cuales se establecen redes muy complejas de transporte bidireccional. El punto de entrada en esta red, y el principal centro de distribución de proteínas, lo constituye el Golgi. Desde él las proteínas se clasifican para ser enviadas a la membrana plasmática (MP), a los endosomas, a la vacuola o ser devueltas al RE. Por otra parte, los endosomas constituyen un segundo centro de clasificación donde se decide si las proteínas procedentes de la MP han de ser degradadas en la vacuola, o bien recicladas hacia al Golgi. A continuación se expone una visión global de las distintas rutas que puede seguir una proteína desde el Golgi, sin embargo, esta es una clasificación muy simplificada del sistema, puesto que a su vez existen múltiples rutas tanto de salida hacia la MP, como de reciclaje y degradación.

## **7.1. El aparato de Golgi**

### **7.1.1. Organización del aparato de Golgi**

Como se acaba de comentar, el aparato de Golgi es el orgánulo receptor de las proteínas que proceden del RE. El Golgi de la mayoría de eucariotas lo componen una serie de cisternas de membrana alargadas apiladas unas con otras. Estas cisternas generalmente se clasifican en *cis*, *medial* y *trans*. Las proteínas de secreción provenientes del RE entran por la cara *cis* del Golgi, progresan a través del Golgi *medial*, donde se modifica su estado de glicosilación, y salen por la cara *trans* (TGN) donde se produce su distribución hacia otros orgánulos.

El Golgi de *S. cerevisiae* es peculiar ya que no presenta la morfología típica con cisternas apiladas sino que su distribución es dispersa. No obstante, las funciones esenciales de cada una de las divisiones del Golgi se mantienen. Por ejemplo, se ha observado que las vesículas COPI solo se generan desde las regiones tempranas del Golgi, mientras que las vesículas recubiertas de clatrina son exclusivas del TGN (Suda & Nakano, 2011).

El modelo más aceptado actualmente para explicar la maduración de la maquinaria de transporte a lo largo del Golgi es el modelo de la maduración cisternal. Este modelo contempla que las cisternas son estructuras transitorias. Las proteínas cargo permanecen en la vesícula mientras ésta madura desde el *cis* al *trans*-Golgi. El proceso de maduración se basa en el transporte retrógrado de las enzimas residentes en el Golgi, que es al menos en parte mediado por vesículas COPI. El mecanismo que media la maduración de las cisternas todavía no está del todo claro, pero una serie de Rab GTPasas podrían jugar un papel importante en este proceso. El reclutamiento y activación de una GTPasa podría ser el desencadenante de la activación de una cascada de GEFs y Rab GTPasas que medien la progresión de la vesícula (Losev et al., 2006; Matsuura-Tokita et al., 2006; Suda & Nakano, 2011).

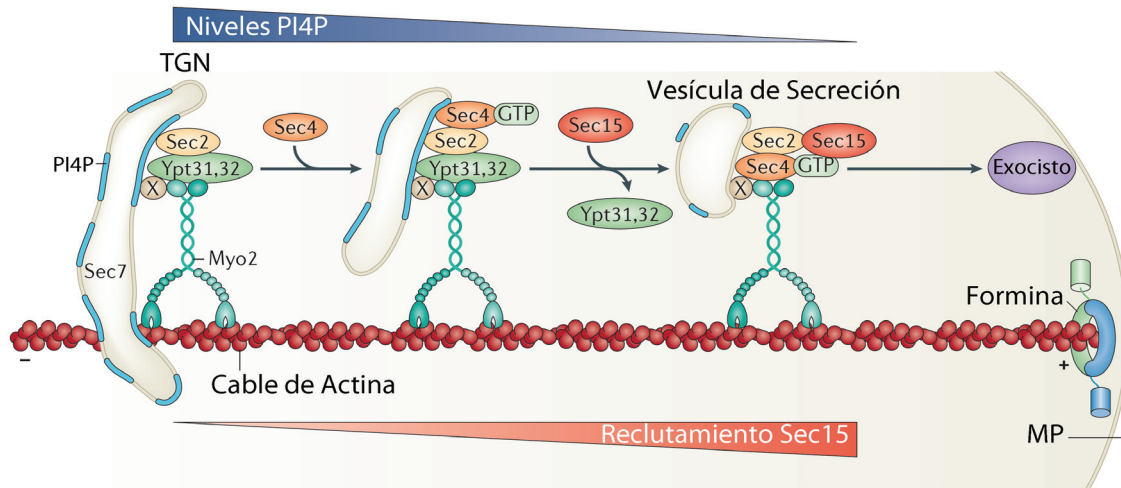
El TGN es el centro de distribución de proteínas hacia el resto de orgánulos, pudiendo transportar las proteínas de vuelta hacia cisternas menos maduras del Golgi, continuar la secreción hacia la MP o endosomas, o bien enviar directamente las proteínas hacia la vacuola. Además, todos estos trasportes son bidireccionales.

En el TGN hay que destacar el importante papel del fosfatidilinositol-4-fosfato (PI4P), ya que es el lípido mayoritario en este orgánulo. El PI4P se distribuye en un gradiente creciente desde las cisternas más tempranas del Golgi hacia el TGN. Este fosfoinosítido se genera por la fosforilación del fosfatidilinositol por la PI4P kinasa, Pik1, mientras que la fosfatasa Sac1 es la responsable de disminuir sus niveles (Santiago-Tirado & Bretscher, 2011). El PI4P juega un papel central en la regulación del transporte anterógrado mediante el reclutamiento de efectores, como se detallará en el siguiente apartado.

### **7.1.2. Salida del TGN hacia la MP**

El número de rutas hacia la MP se desconoce, habiéndose descrito al menos dos clases de vesículas atendiendo a su densidad en gradientes de sacarosa: una fracción ligera y otra densa (Bard & Malhotra, 2006; Harsay, 2002; Harsay & Bretscher, 1995). Por otra parte, podemos hablar de una secreción constitutiva y otra regulada.

A diferencia del transporte entre otros orgánulos que tiene lugar a través de vesículas revestidas, la ruta dirigida hacia la MP tiene lugar a través de transportadores tubulares que se forman sin la intervención de cubiertas. Una excepción sería el complejo del exómero en *S. cerevisiae* del que se ha postulado que actúa como una cubierta (ver sección 7.4.1) (Wang et al., 2006). En *S. cerevisiae* la formación de la vesícula desde el TGN, su transporte y fusión con la MP se produce por el reclutamiento secuencial y activación de una serie de Rab GTPasas (**Figura 11**). Según las vesículas emergen del TGN, las GTPasas Ypt31/32 y los altos niveles de



**Figura 11. Ruta de secreción desde el TGN a la MP.** El gradiente decreciente en los niveles de PI4P desde el TGN a la MP desencadena una cascada de proteínas Rab que permite el reclutamiento secuencial de los factores necesarios para el movimiento de la vesícula y su fusión con la MP. Ver texto para más detalles. Adaptado de (Hammers & Sellers, 2011).

PI4P van a reclutar a Sec2. Esta proteína es el GEF de Sec4, el Rab que regula el transporte y la fusión de las vesículas con la MP. Los niveles de PI4P modulan las propiedades de Sec2, ya que a medida que la concentración de PI4P va disminuyendo, Sec2 pierde afinidad por Ypt31/32 y conversamente la adquiere por la subunidad Sec15 del exocisto, el complejo amarra que actúa en la MP. Gracias a esta afinidad diferencial dependiente de los niveles de PI4P se previene el reclutamiento prematuro del exocisto sobre las membranas del TGN (Jin et al., 2011; Hammer & Sellers, 2011). Las vesículas en su camino hacia la MP son remolcadas a lo largo de los cables de actina por la miosina de tipo V Myo2. La unión entre la vesícula y Myo2 es desempeñada por distintos efectores a lo largo del transporte. En los primeros compases de la gemación son las GTPasas Ypt31/32 y los altos niveles de PI4P quienes median el anclaje de Myo2 con la vesícula. Cuando Ypt31/32 se desprenden de la vesícula y los niveles de PI4P disminuyen, es Sec4 quien pasa a interactuar con Myo2 por el mismo dominio por donde antes lo hacían YPT31/32 (Jin et al., 2011; Hammer & Sellers, 2011).

La incorporación de Sec4 a la vesícula además va a determinar el reclutamiento de los efectores necesarios para que se produzca la fusión con la MP. El reconocimiento de la vesícula en la MP es mediado por el exocisto, mientras que la fusión de membranas se produce por la acción de la pareja de t-SNARE y v-SNARE, Sec9 y Snc1 (Graham & Burd, 2011; Jin et al., 2011; Santiago-Tirado & Bretscher, 2011).

En este momento las proteínas transmembrana transportadas en la vesícula pasan a residir a la MP, hasta que eventualmente sean endocitadas hacia el sistema de endosomas.

## 7.2. Organización de la MP y Endocitosis

### 7.2.1. Dominios de la MP

Clásicamente se han usado métodos bioquímicos para estudiar la organización de la MP, sin embargo la significación biológica de los datos obtenidos mediante estos métodos es ampliamente discutida (Munro, 2003; Tanner et al., 2011). Es por esto que el gran desarrollo de la microscopía en las últimas dos décadas está siendo fundamental para abordar el estudio con mayor claridad (Simons & Gerl, 2010). El caso más llamativo es el de *S. cerevisiae*, donde se empezaron caracterizando una serie de dominios de membrana mutuamente excluyentes que



demostraban claramente que la MP se encuentra lateralmente compartimentalizada. Así, desde 2003 (Malínská et al., 2003) hasta 2009 (Berchtold & Walther, 2009) se han identificado en *S. cerevisiae* tres dominios de membrana definidos por distintas proteínas marcadoras: el MCP (Compartimento de Membrana ocupado por Pma1), el MCC (Compartimento de Membrana ocupado por Can1) y el MCT (Compartimento de Membrana ocupado por TORC2), además de otras proteínas que se encuentran uniformemente distribuidas entre estos tres compartimentos, como son Gap1 y Hxt1 [revisado en (Ziółkowska et al., 2012)].

Ante la avalancha creciente de descripción de dominios, recientemente se ha abordado en un único estudio la situación general de las proteínas de la MP (Spira et al., 2012). En este trabajo demuestran que la MP se auto-organiza en numerosos dominios que se solapan solo parcialmente, de manera que cada proteína transmembranal se adapta a un patrón característico más o menos distinto del de otras proteínas transmembranales. Se piensa que es la afinidad de los segmentos transmembrana por determinados tipos de lípidos lo que define el dominio en el que va a residir cada proteína.

Además de las propias características físico-químicas de los lípidos, existen otros mecanismos por los que la célula es capaz de formar o mantener estos dominios (Ziółkowska et al., 2012). Por ejemplo, es importante que la bicapa sea asimétrica, concentrándose los lípidos con carga negativa, como fosfatidilserina y fosfatidilinosoles en la capa interna; mientras que lípidos neutros, como la fosfatidilcolina y esfingolípidos, se encuentran en la capa externa. Esta distribución asimétrica permite que ciertos lípidos y proteínas se asocien entre sí. Por ejemplo, esteroides y esfingolípidos interaccionan preferentemente entre ellos para formar estructuras líquidas ordenadas, segregándose de otras fases lipídicas más desordenadas. Ciertas proteínas, como las ancladas a GPI tienden a fraccionar en estas fases enriquecidas en esteroides y esfingolípidos (lo que tradicionalmente se denominaron balsas lipídicas) (Simons & Ikonen, 1997).

Un segundo mecanismo implica la actuación de ciertas proteínas a modo de andamios capaces de interaccionar con determinados tipos de lípidos. Este es el caso de los anteriormente citados dominios MCC, o también denominados eisomas. Estas estructuras son invaginaciones alargadas de la MP que se establecen gracias a la acción de Lsp1 y Pil1, dos proteínas con dominios BAR (Bin-Amphyphisin-Rvs) que tienen afinidad por el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P<sub>2</sub>]. Se ha sugerido un posible papel de estas estructuras en la regulación de la endocitosis (Grossmann et al., 2008; Walther et al., 2006), sin embargo esta función está actualmente bajo debate (Brach et al., 2011) ya que no se sabe si los fenotipos de endocitosis observados cuando se altera la estructura de los eisomas son debidas a causas directas o indirectas por cambios en la composición de la membrana. Los únicos datos concluyentes es que los parches de endocitosis y los sitios de exocitosis están excluidos de los eisomas (Brach et al., 2011).

El tercer modelo de establecimiento de dominios de membrana implica la acción de barreras físicas que limitan la difusión de lípidos y proteínas. Un ejemplo claro de ello son las septinas. Estas barreras disminuyen la difusión de lípidos y proteínas (Dobbelaere & Barral, 2004), sin embargo no son capaces de segregar dominios por sí mismas.

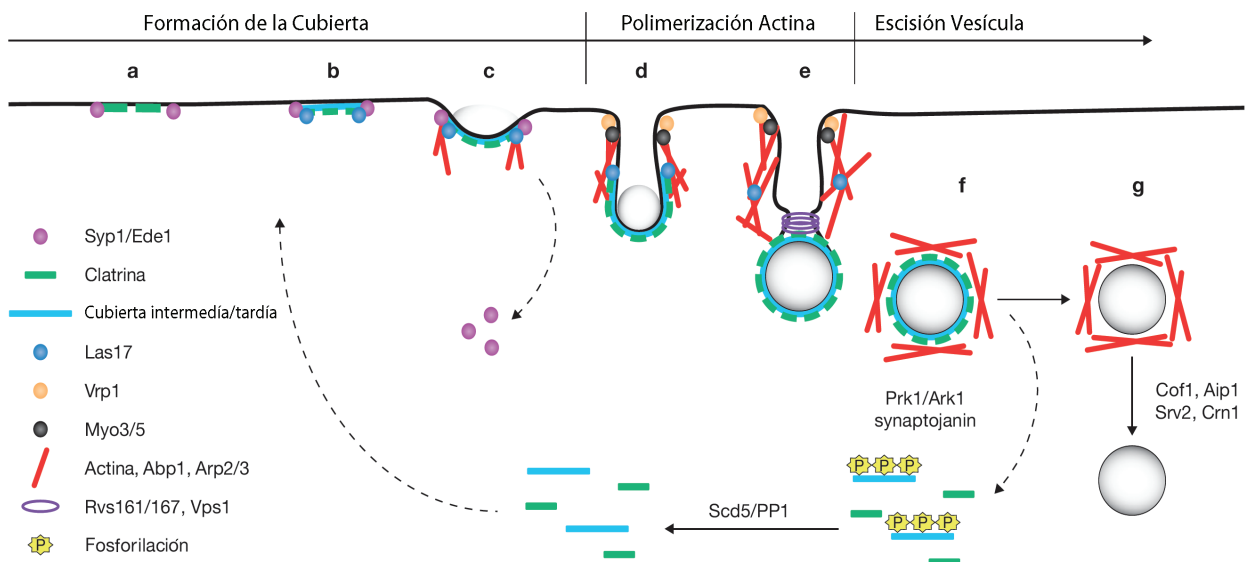
La función molecular de la organización en dominios es compartimentalizar reacciones bioquímicas y conseguir alterar la estructura de la membrana. Estos principios básicos son esenciales en una serie de procesos biológicos como la señalización celular, la regulación del metabolismo de lípidos o la endocitosis, en la que nos centraremos a continuación.

**7.2.2. Endocitosis**

En *S. cerevisiae* la mayoría de eventos endocíticos son mediados por clatrina, aunque se ha descrito recientemente otra endocitosis no mediada por clatrina y dependiente de Rho1 y la formina Bni1 (Prosser et al., 2011).

La endocitosis mediada por clatrina se puede dividir en las siguientes fases [revisado en (Boettner et al., 2012; Weinberg & Drubin, 2012)] (Figura 12):

- Reclutamiento de las proteínas tempranas: estas proteínas tienen la capacidad de unirse a PI(4,5)P<sub>2</sub>, jugando este lípido un papel fundamental en la formación de la vesícula. En *S. cerevisiae* las proteínas tempranas son Ede1 y Syp1. Ede1 es importante para el reclutamiento de otras proteínas más tardías, y Syp1 promueve la formación de parches de actina de forma polarizada en el cuello, aunque su delección no afecta al número de parches de endocitosis (Stimpson et al., 2009).
- Formación de la cubierta: junto con las proteínas tempranas se van a reclutar distintos adaptadores que van a mediar la unión de la clatrina, que es el principal componente de la cubierta. Los adaptadores de clatrina están conservados desde levaduras hasta humanos. En células animales el complejo adaptador de clatrina AP-2 presenta defectos en la internalización de gran variedad de cargos, sin embargo en levaduras no se ha descrito ningún fenotipo relacionado con endocitosis. En el caso de levaduras, las epsinas Ent1 y Ent2, y las proteínas AP180 parecen ser los principales adaptadores que permiten el ensamblaje de la cubierta de clatrina. A continuación, la cubierta madura por el reclutamiento de toda una serie de proteínas, que constituyen las denominadas cubiertas intermedia y tardía, y que permitirán finalmente la unión de los denominados Factores Promotores de la Nucleación (NPF) de actina.



**Figura 12. Modelo molecular para la endocitosis dependiente de clatrina, actina y miosinas tipo I.** La unión de las proteínas tempranas Syp1/Ede1 a la MP determina el ensamblaje de la cubierta cuyo componente principal es la clatrina. A continuación, la polimerización de actina ejerce la fuerza necesaria para producir la invaginación de la membrana que se escindirá por la acción de las anfifisinas Rvs161 y Rvs167. Finalmente, la cubierta de clatrina va a fosforilarse lo que determina su desensamblaje de la vesícula. La posterior desfosforilación de los factores de la cubierta permitirá su reclutamiento en un nuevo evento endocítico. Adaptado de (Boettner et al. 2012).

- Ensamblaje y polimerización de la actina: una vez formada la cubierta, se ensambla una red ramificada de actina que va a desarrollar la tracción necesaria para producir la invaginación de la membrana. El ensamblaje de la actina se inicia con el reclutamiento de los anteriormente citados NPFs. Los NPFs son miembros de las familias WASP y MYO, entre los que cabe destacar el homólogo de WASP *Las17*, y las miosinas de tipo 1 *Myo3/5*, ya que son los NPFs más importantes *in vivo*. Este módulo de proteínas se mantiene asociado a la membrana y promueven la actividad del complejo Arp2/3. El complejo Arp2/3, por su parte, es responsable de la nucleación de la actina. El ensamblaje de filamentos de actina ramificados, junto con la fuerza motora de las miosinas, empuja y deforma la membrana produciendo su invaginación.
- Escisión de la vesícula: para que la vesícula se escinda las membranas de la base de la vesícula tienen que acercarse. En este proceso actúan las anfifisinas *Rvs161* y *Rvs167* que tienen la capacidad para tubular vesículas. La fosfatasa de PI(4,5)P<sub>2</sub> *Slj1* y *Sjl2* (denominadas "synaptojaninas") juegan también un papel fundamental en la escisión de la vesícula. La base de la vesícula está recubierta por proteínas que carecen de dominios de unión a PI(4,5)P<sub>2</sub> y que por tanto va a estar desprotegida de la acción de las fosfatasas. La hidrólisis del PI(4,5)P<sub>2</sub> va a crear una serie de tensiones que deforman esta región y que crea una retroalimentación positiva junto con la acción de las anfifisinas. Se piensa que la dinamina *Vps1* también podría participar en el proceso de escisión. Tras la escisión de la vesícula, todos los PI(4,5)P<sub>2</sub> sin hidrolizados promoviendo el desensamblaje de la maquinaria de endocitosis.

#### Regulación de la endocitosis:

La ubiquitinación es la principal señal que marca a una proteína para ser endocitada. Esta modificación es llevada a cabo por la ubiquitin ligasa *Rsp5*, asistida por una serie de adaptadores, incluyendo las recientemente descritas arrestinas (proteínas ART) ([Lauwers et al., 2010](#); [MacGurn et al., 2012](#)). Las proteínas diana pueden ser ubiquitinadas con una única molécula de ubiquitina en una lisina (monoubiquitinación) o varias lisinas (multiubiquitinación). Alternativamente, moléculas de ubiquitina pueden unirse unas con otras formando cadenas, en las que cada monómero está unido a su vez a una lisina del motivo anterior (poliubiquitinación). Esta variabilidad crea todo un código que determina los distintos destinos de las proteínas. Se ha visto que la unión de un único residuo es suficiente para promover la endocitosis de la proteína, mientras que la poliubiquitinación determina que la proteína sea destinada a la vacuola. En otros casos este código determina el reciclaje de proteínas hacia el TGN ([Chen et al., 2011](#); [Lauwers et al., 2010](#); [MacGurn et al., 2012](#)).

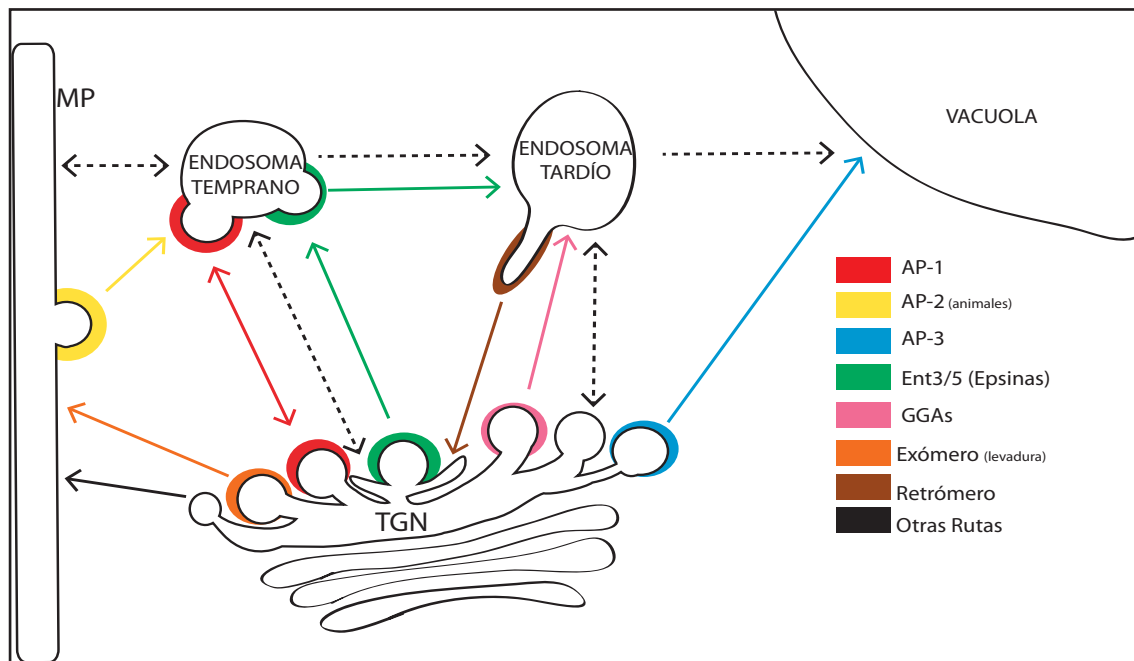
Una de las principales cuestiones de la endocitosis de cargos ubiquitinados es cómo son reconocidos por la maquinaria endocítica. El modelo más aceptado es que varios dominios de unión a ubiquitina (UBDs) presentes entre la maquinaria endocítica pudieran reclutar estos cargos para mediar su internalización. Además, la propia ubiquitinación parece ser un motivo importante entre las proteínas que forman parte del complejo endocítico, ya que además de poseer dominios UBDs, también tienen residuos ubiquitinables. De esta manera, se ha propuesto que la ubiquitinación permitiría la estabilización del complejo endocítico mediante interacciones proteína-proteína ([Weinberg & Drubin, 2012](#)).

Las vesículas generadas del proceso de endocitosis se denominan endosomas, desde las cuales puede producirse el reciclaje de la proteína hacia el TGN, o bien su degradación mediante su transporte a la vacuola.

**7.3. Ruta endocítica: Reciclaje vs Degradación**

**7.3.1. Reciclaje de proteínas transmembranales**

El transporte retrógrado entre endosomas y TGN permite el reciclaje de proteínas de membrana implicadas en un amplio rango de procesos biológicos. Entre las proteínas de membrana que son recuperadas hacia el TGN encontramos SNAREs, como Snc1 (Chen et al., 2005) y Tlg1 (Lewis et al., 2000); las proteasas Ste13 (Foote & Nothwehr, 2006) y Kex2 (Chen et al., 2005); el complejo transportador de hierro Ftr1-Fet3 (Strochlic et al., 2008); el receptor Vps10 (Marcusson et al., 1994); Gap1 (O'Donnell et al., 2010); y la quitín sintasa Chs3 (Valdivia et al., 2002). Si bien el reciclaje de algunas de estas proteínas es constitutivo por la propia naturaleza de su función, como es el caso de las SNAREs; en otros casos el reciclaje es regulado. Este es el caso del complejo transportador de hierro Ftr1-Fet3 y de Gap1, cuyo reciclaje dependerá de la concentración de hierro externa (Strochlic et al., 2008) o de la concentración de aminoácidos (O'Donnell et al., 2010), respectivamente. Comparado con los ejemplos anteriores, el reciclaje de Chs3 es bastante distintivo pues parece obedecer a la peculiar distribución temporal de Chs3 en el cuello a lo largo del ciclo. Además, el reciclaje de Chs3 permite concentrarla en un reservorio intracelular que facilita una respuesta rápida frente a daños en la PC (Valdivia & Schekman, 2003). La maquinaria implicada en el reciclaje de proteínas desde endosomas al TGN es muy variada. La cuestión fundamental es que se produzca la correcta clasificación de las proteínas, segregando aquellas cuyo destino final es la vacuola de las que han de reciclarse. Esta función la desempeñan básicamente dos tipos de cubiertas, la clatrina y el retrómero, así como una amplia variedad de adaptadores de las mismas (Figura 13).



**Figura 13. Cubiertas y adaptadores.** Esquema de las cubiertas y adaptadores que participan en el transporte anterogrado y retrógrado desde el TGN al resto de orgánulos.

## CLATRINA

El transporte bidireccional entre el TGN y los endosomas depende de clatrina. La clatrina carece de dominios de unión a membrana por lo que su reclutamiento desde el citoplasma a la vesícula depende de adaptadores, que además median la interacción con las proteínas cargo. En *S. cerevisiae* se han descrito tres tipos de adaptadores: complejo AP-1, GGAs y las proteínas de tipo epsina (**Figura 13**).

- Complejo AP-1

Es un complejo que pertenece a la familia de proteínas denominadas adaptinas. En *S. cerevisiae* se han descrito tres complejos pertenecientes a esta familia, los complejos AP-1, AP-2 y AP-3, de los cuales solo AP-1 se ha demostrado que sea capaz de unirse a clatrina. En mamíferos se han descrito cinco complejos AP (AP1-5), siendo en este caso AP-1 y AP-2 capaces de unirse a clatrina. Todos ellos están constituidos por cuatro subunidades repartidas en dos adaptinas grandes, una mediana y una pequeña (Boehm & Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2011). AP-1 en el caso de levaduras está formado por las adaptinas grandes Apl1 y Apl2, la adaptina mediana Apm1 y la adaptina pequeña Aps1 (Boehm & Bonifacino, 2001).

Cada uno de los complejos AP tiene distinta localización y función. El complejo AP-1 se localiza en endosomas y TGN, estando implicado en el tráfico bidireccional entre estos dos orgánulos. AP-2 es el más caracterizado en células animales donde media la endocitosis por clatrina, si bien no se conoce función alguna en levaduras. Por último, AP-3 está implicado en el transporte desde TGN hacia endosomas tardíos (Bowers & Stevens, 2005; Hirst et al., 2011). En mamíferos el complejo AP-1 media el transporte entre TGN y endosomas del receptor de la manosa 6-fosfato (MPR), si bien existe controversia acerca de la dirección de este transporte (Robinson et al., 2010). En levaduras media la recuperación desde endosomas de Kex2 (Ha et al., 2003), Tlg1 (Yeung & Payne, 2001), Chs3 (Valdivia et al., 2002), Ste13 (Foote & Nothwehr, 2006) y Gap1 (O'Donnell et al., 2010); y de Fus1 en conjugación (Barfield et al., 2009). También dirige el transporte de la translocasa de fosfolípidos Drs2 desde el TGN hacia endosomas, siendo Drs2 parte fundamental en el propio funcionamiento del complejo AP-1 (Liu et al., 2008). Mutantes deficientes en el complejo AP-1 presentan estas proteínas deslocalizadas en la MP o la vacuola, en lugar de encontrarse eficientemente retenidas en el TGN/endosomas.

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

Son adaptadores monoméricos que se identificaron inicialmente en base a su similitud con la secuencia del dominio "ear" C-terminal de AP-1. 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 a endosomas tardíos de las proteínas CPY (carboxipeptidasa Y), CPS (carboxipeptidasa S), Pep12 y de la permeasa Gap1, siendo en este último caso el transporte dependiente de ubiquitinación (Bonifacino, 2004b; Scott et al., 2004).

- Proteínas de tipo epsina: Ent3 y Ent5

Los últimos adaptadores de clatrina descritos en levaduras son las proteínas parecidas a epsina Ent3 y Ent5. La delección de cada uno de estos adaptadores monoméricos por separado manifiesta fenotipos muy débiles, lo que sugiere que tienen funciones redundantes. El mutante doble *ent3Δent5Δ* tiene afectada la retención de Chs3 en el TGN/endosomas (Copic et al., 2007), y presenta defectos en el transporte de la CPS y CPY a la vacuola (Duncan et al., 2003). Se ha visto además que estas dos proteínas colaboran con la subunidad Vps27 del ESCRT-0 en el envío de proteínas al endosoma tardío (Eugster et al., 2004b).

Existe una amplia red de interacciones entre todos estos adaptadores, tanto a nivel de interacciones físicas como de aparente solapamiento de funciones, lo que hace difícil definir la función específica de cada uno de ellos (Duncan et al., 2003; Costaguta et al., 2006). Mediante un análisis detallado de la co-localización y dinámica de estas proteínas se ha descrito que estos adaptadores se reclutan secuencialmente sobre la misma vesícula en dos olas coordinadas en el tiempo, marcadas por una concentración creciente de PI4P generado por Pik1. La secuencia de acontecimientos es la siguiente: en primer lugar se reclutan dos proteínas en la membrana del TGN, por un lado la GTPasa requerida para la formación de la cubierta de clatrina, Arf1, y por otro Pik1. Arf1 y los niveles moderados de PI4P sintetizados por Pik1 permiten el reclutamiento de Gga2. Esto será el desencadenante de una retroalimentación positiva, ya que Gga2 a su vez es capaz de reclutar más Pik1, incrementando los niveles locales de PI4P y con ellos más Gga2. Gga2 a su vez es capaz de interactuar con Ent3, que se une a SNAREs que marcarán la membrana de destino con la que se fusionará la vesícula. El incremento en los niveles de PI4P dará lugar a la segunda ola de reclutamiento, incorporándose finalmente los adaptadores AP-1 y Ent5 (Daboussi et al., 2012). Además se ha visto que Ent5 posee un dominio autorregulador responsable de la separación temporal de estas dos olas (Hung et al., 2012).

### RETRÓMERO

El retrómero es también una cubierta que media la recuperación de proteínas desde los endosomas hacia el TGN (**Figura 13**). Se descubrió en levaduras como el complejo que recuperaba el receptor Vps10 desde compartimentos prevacuolares al TGN (Seaman, 2005). También se ha descrito una función análoga en células animales, recuperando el receptor de la manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPI) (Arighi, 2004). Otras proteínas cargos del retrómero en levaduras son Kex2, Yif1, la dipeptidil aminotransferasa (DPAP A) y el transportador de hierro Fet3-Ftr1 (Collins, 2008; Strohlic et al., 2008).

El retrómero está conservado en levaduras y mamíferos. Su ensamblaje está coordinado por Ypt7 (Balderhaar et al., 2010; Liu et al., 2012), y consta de dos subcomplejos, un heterotrímero formado por las proteínas Vps26, Vps29 y Vps35; y un heterodímero pequeño formado por dos proteínas de la familia SNX (sorting nexin), que en levaduras se corresponde con las proteínas Vps5 y Vps17 (Collins, 2008). Las SNXs median la deformación de la membrana endosomal dando lugar a estructuras tubulares, mientras que el reconocimiento de las proteínas cargo es desempeñado por el subcomplejo heterotrimerico. También se ha descrito la existencia de adaptadores, como la proteína Snx3 que media el reconocimiento del complejo transportador de hierro Ftr1-Fet3 (Strohlic et al., 2007).

La vesículas procedentes de los endosomas se dirigen a continuación hacia el TGN, donde van a ser reconocidas por el complejo amarra GARP (Golgi-Associated Retrograde Protein). GARP consta de las subunidades Vps51-Vps52-Vps53-Vps54, y es reclutado por la Rab Ypt6 (Cullen & Korswagen, 2011; Bonifacino & Hierro, 2011; McGough & Cullen, 2011).

No se sabe cuál es el papel específico que juegan el retrómero y las vesículas revestidas de clatrina en el reciclaje de proteínas. Una posibilidad es que el retrómero recupere proteínas desde endosomas tardíos, mientras que la clatrina sea la responsable del reciclaje desde los endosomas tempranos. No obstante, cada vez existen más evidencias de que estas dos cubiertas no son necesariamente dos mecanismos distintos de retorno de proteínas, sino que también pudieran actuar en tándem. Se ha propuesto que inicialmente la cubierta de clatrina (quizá reclutada por el complejo AP-1) concentraría específicamente ciertas proteínas para favorecer posteriormente su incorporación en los túbulos de membrana formados por el retrómero (Popoff et al., 2009; McGough & Cullen, 2011; McGough & Cullen, 2012).

### 7.3.4. Degradación de proteínas transmembranales: El camino hacia la vacuola

El último paso en la vida de una proteína de membrana es su degradación en la vacuola. Las proteínas que provienen de la ruta endocítica son transportadas desde los endosomas tempranos a los endosomas tardíos, desde donde posteriormente son vertidas a la vacuola. Además, algunas proteínas son directamente transportadas desde el TGN a la vacuola sin pasar previamente por la MP.

- Ruta endocítica hacia la vacuola

En levaduras, Vps21 (también denominada Ypt51), el homólogo de Rab5 en mamíferos, coordina la formación de los endosomas tempranos, mientras que la regulación de la dinámica de los endosomas tardíos y la vacuola recae en Ypt7, el homólogo de Rab7 de mamíferos. Se asume que la distribución de estas dos proteínas determina y refleja la identidad del orgánulo, de manera que el paso de endosomas tempranos a endosomas tardíos está marcado por el desplazamiento de una GTPasa por otra (Spang, 2009b). Vps21 recluta al complejo amarra CORVET, que promueve la fusión de los endosomas con las vesículas derivadas del Golgi (Bröcker et al., 2010; Epp et al., 2011). CORVET además es capaz de reclutar a Mon1-Ccz1, el GEF de Ypt7, lo que marca el paso de endosoma temprano a endosoma tardío. A continuación Ypt7 activo recluta a su efector, el complejo de anclaje HOPS. HOPS finalmente determinará la fusión del endosoma tardío con la vacuola. Además, también se ha definido a Ypt7 como el regulador del reclutamiento del retrómero, esto hace pensar en un papel integrativo de esta Rab, equilibrando el reciclaje con la degradación (Balderhaar et al., 2010; Liu et al., 2012).

Mediante microscopía electrónica se ha observado que el endosoma tardío muestra un conjunto de vesículas intraluminales (intralumenal vesicles o ILVs), por lo que también se le ha denominado Cuerpo Multivesicular (Multivesicular Body o MVB) (Prescianotto-Baschong & Riezman, 1998). Estas vesículas son resultado de la internalización hacia el lumen del endosoma de las proteínas transmembranales. La formación de ILVs requiere una maquinaria especializada denominada ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) que a su vez está formada por cinco subcomplejos: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y Vps4 [Revisado en (Hurley & Hanson, 2010) y (Henne et al., 2011)]. Por último, el MVB se fusionará con la vacuola a la cual vierte las ILVs para que sean degradadas por las proteasas vacuolares (Henne et al., 2011).

- Ruta CPY

Es una ruta que dirige proteínas desde el TGN a la vacuola usando los endosomas como compartimento intermediario (**Figura 8**). Su nombre proviene del primer cargo que se describió que seguía esta ruta, la Carboxipeptidasa Y (CPY). La CPY se sintetiza en el RE como un precursor que ha de ser procesado en la vacuola. Cuando llega al TGN la CPY es captada por su receptor, Vps10. A continuación este complejo es transportado al endosoma en vesículas recubiertas por clatrina ensamblada sobre las proteínas adaptadoras Gga1 y Gga2. Ya en el endosoma tardío, Vps10 se disocia de su cargo y es devuelto al TGN por el retrómero. Por otro lado, la CPY es sustrato del complejo ESCRT siendo internalizado en el MVB para posteriormente ser activada mediante proteólisis en la vacuola. Además de la CPY otras proteínas que siguen esta ruta son Kex2, Ste13, Dap2, Vph1, PrA y PrB (Bowers & Stevens, 2005; Conibear & Stevens, 1998).

- Ruta AP-3 ó ALP

Esta ruta va directa a la vacuola desde el TGN sin pasar por intermediarios endosómicos, y debe su nombre a la fosfatasa alcalina (ALP) (**Figura 8**). Se descubrió al ver que ALP era capaz de alcanzar la vacuola en mutantes Vps (Vacuolar Protein Sorting), en los que el paso desde el MVB a la vacuola está bloqueado. En este transporte se requiere el complejo adaptador AP-3, sin embargo es independiente de clatrina. Otras proteínas que siguen esta ruta son la SNARE Vam3, la caseína kinasa Yck3 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, al eludir el paso por MVB, funciona para dirigir proteínas de manera directa y selectiva hacia la membrana de la vacuola.

### 7.4. Chs3 en la ruta de secreción tardía

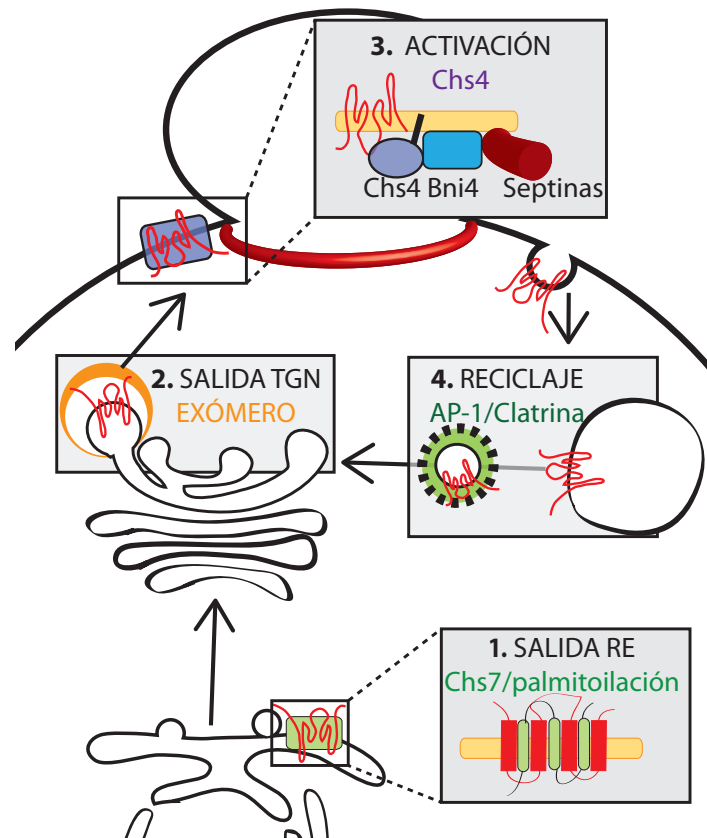
Una vez que Chs3 alcanza el Golgi, su siguiente destino es la MP, donde catalizará la síntesis de quitina y tras lo cual será endocitada. A diferencia de otras muchas proteínas procedentes de la ruta endocítica, Chs3 no es destinada a la vacuola, sino que se recicla activamente desde los endosomas tempranos hacia el TGN. Chs3 hace uso de los factores generales del tráfico intracelular, pero además posee una serie de proteínas exclusivamente dedicadas a su tránsito por la ruta de secreción tardía.

#### 7.4.1. Salida de Chs3 del TGN: El Exómero

Después de salir del RE, Chs3 se concentra en el TGN para ser exportada de forma polarizada hacia la MP en vesículas que migran en la fracción ligera en gradientes de densidad (Valdivia et al., 2002). La exportación de Chs3 del TGN es dependiente de dos proteínas, Chs5 y Chs6 (Figura 14). En ausencia de cualquiera de las dos no hay síntesis de quitina ya que Chs3 queda retenida en el TGN, y solo se detecta algo de actividad QSIII *in vitro* en el mutante *chs6Δ* (Bulawa, 1993; Santos et al., 1997; Ziman et al., 1998).

Ambas proteínas Chs forman parte de un complejo denominado exómero. Existe controversia en definir al exómero como una cubierta o no, ya que a pesar de que recubre membranas, no es capaz de deformarlas (Wang et al., 2006). El exómero está constituido por la proteína Chs5 y una familia de proteínas denominadas ChAPs (Chs5-and-Arf1-binding proteins) que incluye a los parálogos Chs6, Bud7, Bch1, y Bch2 (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006; Ziman et al., 1998). Chs5 y las ChAPs son reclutadas desde el citosol a la membrana del TGN por la GTPasa Arf1 (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Estudios estructurales recientes sugieren que Chs5 forma homodímeros, donde cada uno de las moléculas de Chs5 a su vez coordina la unión de una ChAP (Paczkowski et al., 2012).

La formación de esta cubierta es jerárquica, ya que el reclutamiento de las ChAPs a la membrana depende del autoensamblaje de Chs5 (Trautwein et al., 2006). El dominio N-terminal de Chs5 es necesario y suficiente



**Figura 14. Factores del tráfico intracelular de Chs3.**

1. La exportación de Chs3 del RE depende de la chaperona Chs7 y de palmitoilación.
2. Chs5 y Chs6 constituyen el exómero, una cubierta necesaria para la salida de Chs3 desde el TGN hacia la superficie celular.
3. Chs4 activa a Chs3 en el cuello y media su anclaje al anillo de septinas a través de la proteína Bni4.
4. Después de ser endocitada, Chs3 va a ser reciclada hacia el TGN en vesículas recubiertas por clatrina reclutada por los adaptadores AP-1 y Ent3/5.



para reclutar a Chs5 sobre el TGN y promover la salida de Chs3 hacia la MP (Martín-García et al., 2010). Este dominio consta del motivo de dimerización de Chs5, una  $\alpha$ -hélice por la que Chs5 se une a Chs6, y dos motivos FN3 y BRCT, uno yuxtapuesto al otro, que son necesarios para la interacción de Chs5 con Arf1 (Martín-García et al., 2010; Paczkowski et al., 2012). Por otra parte, se piensa que las ChAPs son las responsables de la interacción con las proteínas cargo, y por tanto de la especificidad, ya que la delección de cada una de las ChAPs, o combinaciones de ellas, conlleva defectos celulares específicos (por ejemplo, *chs6* $\Delta$  muestra defectos en la síntesis de quitina y *bch1* $\Delta$  es sensible a amonio) (Trautwein et al., 2006). Además de estas proteínas, se piensa que deben intervenir otros factores que lleven a cabo la deformación de la vesícula (Wang et al., 2006).

Solamente se han descrito hasta el momento dos cargos del exómero: la quitín sintasa Chs3 (Santos & Snyder, 1997; Trautwein et al., 2006; Ziman et al., 1998) y Fus1 (Barfield et al., 2009), sin embargo los fenotipos mostrados por los mutantes del complejo apuntan a que debe haber más (Trautwein et al., 2006).

A pesar de poseer un complejo específico para la salida del TGN, Chs3 se adapta a la ruta general de exocitosis. Su transporte depende de la proteína Myo2, lo que indica que las vesículas de Chs3 se transportan por los cables de actina (Santos et al., 1997). Además requiere de las tres Rab GTPasas que actúan en secreción: Ypt31/32 y Sec4. La sobreexpresión de Ypt32 produce una mayor llegada de Chs3 a la MP y elude la retención típica del mutante *chs5* $\Delta$ . La delección de Ypt31 e Ypt32 se traduce en una mayor acumulación de Chs3 en vesículas intracelulares (Ortiz & Novick, 2006; Zanolari et al., 2011). Además, esta retención es diferente dependiendo del momento del ciclo celular, de manera que *ypt31* $\Delta$  no tiene afectada la localización de Chs3 en el caso de yemas grandes, pero sí posee considerablemente reducido el número de células con señal en el cuello en yemas pequeñas. Estos resultados sugieren que los factores que regulan la localización de Chs3 son distintos en las fases iniciales del ciclo que en las fases finales (Zanolari et al., 2011). En esta misma dirección apunta la distribución de Chs3 en el mutante *sro7* $\Delta$ . Este efector de Sec4 se requiere en las últimas fases de la fusión con la MP reclutando a Myo2, SNAREs y al exocisto (Forsmark et al., 2011). Al contrario de lo que ocurre con la delección de YPT31, el defecto en el tráfico de Chs3 en el mutante *sro7* $\Delta$  parece más acusado en yemas grandes que en pequeñas, sugiriendo de nuevo que la regulación en las fases tempranas y tardías del ciclo obedece a distintos mecanismos que todavía quedan por desvelar (Zanolari et al., 2011).

Por último, Chs3 depende de la maquinaria de fusión de membranas general para llegar a la MP. Tanto la delección de Sec4, la Rab GTPasa que dirige esta fusión, como mutantes del exocisto tienen afectada la llegada de Chs3 al cuello (Valdivia et al., 2002; Zanolari et al., 2011).

#### 7.4.2. Chs3 en la MP y Endocitosis: Chs4

Una vez que Chs3 ha alcanzado la MP, su estabilidad y activación en la misma depende de Chs4, otra proteína exclusivamente dedicada a la regulación de Chs3 (Figura 14). El mutante *chs4* $\Delta$ , a pesar de carecer de quitina *in vivo*, presenta actividad quitín sintasa *in vitro*, siendo ésta dependiente del tratamiento de las membranas con tripsina (Choi et al., 1994).

Chs3 y Chs4 interaccionan físicamente y la sobreexpresión de *CHS4* aumenta considerablemente la actividad de Chs3, lo que sugiere que Chs4 es un activador de la actividad QSIII (Ono et al., 2000), aunque se desconoce el mecanismo molecular de esta activación. Además de esta función activadora, Chs4 participa en la localización de Chs3 en el septo. Mediante un ensayo de interacción de dos híbridos se propuso un modelo de anclaje de Chs3 al anillo de septinas (DeMarini et al., 1997). Chs3, inserta en la MP, interacciona con Chs4 y ésta a su vez con Bni4, una proteína con funciones más generales en el ensamblaje de la maquinaria del septo (Figura 1) (Kozubowski et al., 2003; Sanz et al., 2004). Más tarde se ha propuesto que la función de Bni4, en relación con la síntesis de quitina, es reclutar de manera restringida en el cuello y en el

tiempo a la subunidad catalítica de la proteína fosfatasa 1 (Glc7) regulando su actividad, lo que le permitiría actuar sobre un sustrato todavía no identificado requerido para el reclutamiento de la QSIII (Larson et al., 2008).

En ausencia de Chs4 el número de células que presentan a Chs3 en el cuello es una quinta parte que en la cepa silvestre. Esta deficiencia no se debe a defectos en el transporte de Chs3 hacia la MP, puesto que la inhibición de la endocitosis produce la depleción de las vesículas intracelulares que contienen a Chs3, pasando ésta a distribuirse uniformemente por toda la MP. Estos datos sugieren que Chs4 transloca y estabiliza a Chs3 en la MP previniendo su endocitosis prematura. Dicha translocación, además, parece ir unida a la activación enzimática de la QSIII. Así, Chs4 es un elemento clave para mantener un equilibrio dinámico entre el transporte anterógrado hacia la zona del septo y la endocitosis en esa región (Reyes et al., 2007).

Chs4 se encuentra farnesilada en el extremo carboxi-terminal de la proteína (Grabińska et al., 2007), aunque existe cierta controversia respecto a la función biológica de esta modificación. Algunos autores proponen que está directamente relacionada con la activación de Chs3 (Grabińska et al., 2007), aunque otros grupos han demostrado que el dominio de prenilación no es esencial para la síntesis de quitina (DeMarini et al., 1997; Ono et al., 2000; Reyes et al., 2007; Trilla et al., 1997).

Durante el proceso de esporulación Chs4 se degrada muy rápidamente, pero a cambio se expresa su homólogo Shc1. Sch1 no se expresa en vegetativo, pero bajo un promotor inducible es capaz de restaurar la síntesis de quitina en el mutante *chs4*  $\Delta$ . Curiosamente la distribución de esta quitina es uniforme por toda la PC, lo que sugiere que Shc1 es capaz de activar a Chs3, pero no de anclarla en la zona del cuello. Este resultado es bastante lógico si tenemos en cuenta que durante el proceso de esporulación la quitina desacetilada se distribuye uniformemente (**Figura 6**) y no existe anillo de septinas que determine su posición. Todos estos datos indican que Shc1 es un homólogo funcional de Chs4 específico de la regulación postraduccional de la QSIII durante el proceso de esporulación (Sanz et al., 2002).

Chs3 se inactivaría funcionalmente mediante endocitosis (Chuang & Schekman, 1996; Ziman et al., 1996), aunque se desconoce cuáles son las señales que dirigen este proceso. Los tres homólogos de Rab5 en *S. cerevisiae*, Ypt51, Ypt52 e Ypt53 (que son reguladores de las primeras etapas de la ruta endocítica), están implicados en este proceso, ya que el mutante triple muestra una acumulación de Chs3 por toda la MP. Además, se ha propuesto que Ypt31 podría regular la internalización de Chs3 en ciertas fases del ciclo, ya que en ausencia de esta GTPasa se reduce el tiempo de residencia en el cuello en yemas pequeñas, posiblemente debida a una endocitosis prematura de Chs3 (Zanolari et al., 2011).

#### **7.4.3. Reciclaje de Chs3: Vesículas de clatrina**

El reciclaje de Chs3 desde los endosomas al TGN depende de vesículas recubiertas de clatrina ensambladas por distintos tipos de adaptadores: el complejo AP-1 (Valdivia et al., 2002), las proteínas de tipo epsina Ent3/Ent5 (Copic et al., 2007) y en menor medida por los adaptadores GGAs (Copic et al., 2007). En ausencia de estos adaptadores el transporte de Chs3 diverge de la ruta típica de exocitosis, de manera que Chs3 es capaz de alcanzar la MP independientemente del exómero. Se desconoce la naturaleza de esta ruta alternativa pero se piensa que parte directamente desde los endosomas (Valdivia et al., 2002). Por tanto, la cubierta de clatrina retiene a Chs3 en el sistema formado por el TGN y los endosomas, previniendo su acceso a otras rutas dirigidas hacia la MP o la vacuola. Los datos de interacciones genéticas y físicas, y la colocalización entre los adaptadores mencionados evidencian una colaboración estrecha entre ellos, haciendo difícil discernir el papel exacto que desempeñan en la distribución de Chs3.

Finalmente, las vesículas de reciclaje de Chs3 derivadas de los endosomas han de fusionarse con el TGN, siendo la t-SNARE Tlg1 un elemento importante en este evento (Holthuis et al., 1998). Tlg1, junto con las t-SNAREs Tlg2 y Vti1, forma parte de la maquinaria localizada en el TGN para la fusión de vesículas procedentes de los endosomas. Además, Tlg1 interacciona específicamente con la subunidad Vps51 del complejo de anclaje GARP (Siniosoglou & Pelham, 2002).

Los niveles de PI4P también juegan un papel esencial en el correcto reciclaje de Chs3. Un incremento de la concentración de este fosfoinosítido, bien por la delección de la fosfatasa responsable de su eliminación, Sac1, o por la sobreexpresión de la kinasa que da lugar a su síntesis, Pik1, provoca un incremento de Chs3 en la vacuola y mayores niveles de Chs3 en la MP (Schorr et al., 2001).

#### 7.4.4. Regulación de la QSIII durante conjugación

Durante el proceso de conjugación tiene lugar un intenso transporte de membrana hacia la región de la MP desde donde proviene la señalización inducida por la unión de la feromona. El transporte polarizado provoca el desarrollo de una proyección sobre la superficie celular dando lugar a células alargadas denominadas *shmoos*. Las proteínas que son transportadas en el flujo de vesículas hacia la MP van a distribuirse de manera polarizada en la punta de la proyección sexual.

La ausencia de un anclaje físico durante conjugación, como son las septinas durante el crecimiento vegetativo, hace de este tipo de crecimiento un modelo perfecto para el estudio de los mecanismos de polarización celular exclusivamente dependientes del tráfico de membranas. Se ha especulado que la base molecular de dichos mecanismos implica una velocidad de difusión lenta de las proteínas de la MP de levaduras, si la comparamos con las proteínas de células de mamíferos. La reducida capacidad de las proteínas de membrana para difundir por la MP permitiría establecer un equilibrio dinámico en la punta del *shmoo* entre el transporte polarizado y la endocitosis, siendo Snc1 un ejemplo claro de este tipo de regulación (Valdez-Taubas & Pelham, 2003). Alternativamente, ciertas proteínas de membrana, como Fus1, no dependerían de la endocitosis para mantenerse concentradas en la punta del *shmoo*, y su polarización vendría determinada por su capacidad para anclarse a proteínas periféricas que actúan a modo de andamiaje (Proszynski et al., 2006). Sin embargo, como demostramos en este trabajo, los mecanismos que rigen la polarización de Chs3 durante conjugación tienen que ser diferentes a los dos anteriores, ya que Chs3 no se encuentra concentrada en la punta sino que se localiza distribuida por toda la proyección sexual (Santos et al., 1997).

La función de la quitina en conjugación es decisiva, ya que los mutantes afectados en su síntesis presentan una reducida eficacia de conjugación (Santos et al., 1997; Trilla et al., 1997; Trilla et al., 1999). La localización de la quitina está restringida en la base de la proyección (**Figura 6**) y sus niveles son tres veces mayores que en vegetativo, lo cual coincide con un fuerte incremento de los niveles de Chs3 y Chs7 (Cos et al., 1998; Trilla et al., 1999). Además, Chs4 y Chs5 son también esenciales para la síntesis de quitina durante este proceso. La cepa *chs5Δ* presenta graves defectos en la fusión celular durante conjugación, ya que no solo interviene en el transporte polarizado de Chs3, sino también en el de Fus1, que está implicada directamente en la fusión de los *shmoos* (Santos & Snyder, 2003).



# Metodología, Resultados y Discusión

---





En esta sección de la memoria se desarrolla el trabajo experimental llevado a cabo, incluyendo la metodología empleada y la discusión surgida del trabajo científico. Todo ello se ha dividido en tres capítulos, cada uno de los cuales supone una línea de investigación independiente aunque cada una de ellas está propuesta y desarrollada dentro del objetivo global de este trabajo y que da título a esta memoria: Profundizar en los mecanismos moleculares implicados en la regulación del tráfico intracelular de la actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*. Una discusión general, con datos adicionales y que engloba al conjunto de la investigación, se abordará en otra sección independiente de la memoria.

Cada capítulo consta de un artículo científico y que es el resultado de cada línea de investigación. Además, los artículos están precedidos de una pequeña introducción en la que se explican los antecedentes y objetivos planteados al inicio de cada trabajo, y de un breve resumen en castellano de los resultados obtenidos que facilita la revisión rápida de la información contenida en los mismos.

Además, el Apéndice de la memoria (página 119) consta de un cuarto artículo publicado en colaboración con el laboratorio de la Dra. Spang y que recoge parte de los resultados de esta tesis. El material suplementario correspondiente a cada uno de los artículos mencionados se encuentra recogido al final de la versión digital de la tesis.

#### **CAPÍTULO 1:**

Jimenez, C\*, Sacristán, C\*, Roncero, M. I. G. & Roncero, C. (2010). Amino acid divergence between the *CHS* domain contributes to the different intracellular behaviour of Family II fungal chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology* 47, 1034–1043.

#### **CAPÍTULO 2:**

Sacristán C., Manzano-Lopez L., Reyes R., Spang A., Muñiz M., & Roncero C. (2012). Dimerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *En revisión*.

#### **CAPÍTULO 3:**

Sacristán, 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.





# CAPÍTULO 1

**CARACTERIZACIÓN DE QUITÍN SINTASAS DE LA FAMILIA 2 DE DISTINTOS HONGOS EN *Saccharomyces cerevisiae*.**

---



## ANTECEDENTES

La quitina está universalmente distribuida en el reino Fungi. El hecho de que sea esencial para garantizar la viabilidad de la célula fúngica y que esté ausente en animales y plantas, la convierte en una diana idónea frente a la que desarrollar antifúngicos. El diseño de estas drogas requiere necesariamente profundizar en los mecanismos que subyacen a la síntesis de quitina. Dichos mecanismos han sido ampliamente caracterizados en *S. cerevisiae*, sin embargo, el abordaje de los mismos estudios en otro tipo de hongos es mucho más complejo, en especial si nos referimos a hongos filamentosos.

*S. cerevisiae* posee únicamente tres actividades QS: la QSI y QSII, que pertenecen a la Familia 1 de la clasificación de QS; y la QSIII que se incluye dentro de la clase IV de la Familia 2. Los hongos filamentosos en cambio albergan hasta más de 10 actividades QS distintas, las cuales se distribuyen en distintas clases dentro de las dos Familias [revisado en (Roncero, 2002)]. Dada esta gran redundancia de actividades QS, es difícil discernir qué papel desempeña cada una mediante la simple delección de genes *CHS*. Además, las técnicas de manipulación genética para llevar a cabo estos estudios son limitadas, sobre todo si las comparamos con las disponibles para *S. cerevisiae*. Es por todo ello que distintos trabajos han usado con anterioridad a *S. cerevisiae* como un sistema ameno en el que expresar heterológamente genes *CHS* para estudiar su función.

Dado que Chs3 es el único representante de la Familia 2 en *S. cerevisiae* y que su actividad es fácilmente distinguible de las otras dos actividades QS, la expresión heteróloga en *S. cerevisiae* de genes relacionados con *CHS3* nos ofrecía a priori una metodología prometedora para abordar el estudio de la síntesis de quitina en otros hongos. Así, nos planteamos los objetivos que se detallan a continuación.

## OBJETIVOS

1. Estudiar el papel de las QS de las clases IV y V mediante su expresión heteróloga en *S. cerevisiae*.
2. Profundizar en la estructura-función del dominio *CHS* de Chs3 de *S. cerevisiae*.

## TRABAJO EXPERIMENTAL

### Aproximación al estudio de genes *CHS* de la Familia 2 en *S. cerevisiae*

Como primera aproximación al estudio de las QS en hongos, expresamos heterológamente los genes *CaCHS3* de *Candida albicans* y *FoCHSV* de *Fussarium oxysporum* en el mutante *chs3Δ* de *S. cerevisiae*. Ninguno de los productos de los dos genes fue capaz de restaurar la síntesis de quitina, quedando ambas proteínas retenidas en distintos compartimento intracelulares.

El gen *CaCHS3* pertenece a la clase IV, siendo el miembro de la clasificación filogenética más cercano a *ScCHS3*. *CaChs3* en *S. cerevisiae* quedaba retenida en el RE. Dado que la expresión de *ScCHS7* en *C. albicans* no es capaz de rescatar a *CaCHS3* del RE (Sanz et al., 2005), es probable que la retención observada en *S. cerevisiae* se deba a la incapacidad de *ScChs7* de reconocer a *CaChs3*. Además también es posible que la maquinaria de salida del RE no esté tampoco conservada en los dos organismos. De este resultado se deduce que la interacción entre Chs3 y Chs7 en sus respectivos organismos es altamente específica, y que dichas interacciones no están evolutivamente conservadas.

*FoCHSV* pertenece a la clase V y por tanto está más alejada filogenéticamente de *ScCHS3*. Sorprendentemente, esta proteína fue capaz de salir del RE, incluso en ausencia de Chs7, lo que sugiere que los mecanismos de transporte de las clases IV y V son muy distintos. En cambio la

proteína quedaba retenida en vesículas intracelulares, que posiblemente se correspondan con el aparato de Golgi. La clase V se caracteriza por la presencia de un dominio motor parecido a miosina (MMD) en el extremo N-terminal de la enzima. Clásicamente se ha discutido que este dominio podría actuar como motor para mediar la movilidad de las QS de clase V (Treitschke et al., 2010). Sin embargo, la eliminación del dominio MDM no alteró la localización de FoChsV-GFP en *S. cerevisiae*. Este resultado es acorde con trabajos recientes que indican que la movilidad de Msc1, una QS de clase V de *Ustilago maydis*, es independiente del dominio MMD, pero dependiente de cables de actina y microtúbulos (Schuster et al., 2011; Steinberg, 2011). Este modelo propone que las vesículas que portan a Msc1 se mueven usando los elementos del citoesqueleto para alcanzar la región de la MP donde ha de depositarse la QS, de manera que el papel del dominio MMD sería mediar el anclaje con la MP y favorecer la translocación de la proteína. La ausencia o divergencia evolutiva en *S. cerevisiae* de los factores a los que se ancla el dominio MMD en la MP explicarían la acumulación intracelular de FoChsV-GFP.

### **La construcción de quimeras como metodología para el estudio de la síntesis de quitina**

Como alternativa a la expresión heteróloga de genes *CHS*, que como se acaba de comentar resultó infructuosa, decidimos construir quimeras en las cuales sustituimos el dominio *CHS* de ScCHS3 por el dominio equivalente de otras quitín sintetasas de la Familia II (en los siguientes párrafos las quimeras se denominarán con el nombre del gen del que proceden).

Uno de los objetivos de esta aproximación era poder asignar actividad catalítica a genes *CHS* no caracterizados hasta el momento. En este sentido, todas las quimeras de clase IV fueron funcionales cuando se expresaron en el mutante *chs3Δ* de *S. cerevisiae*. Entre ellas cabe destacar a CnChs1 de *Cryptococcus neoformans* y AfChsF de *Aspergillus fumigatus*, ya que es la primera evidencia experimental que atribuye actividad catalítica a dichas proteínas. Este resultado es especialmente significativo en el caso de hongos filamentosos, donde todos los mutantes en los que se ha delecionado el gen *CHS* de clase IV carecen de fenotipos evidentes (Latge, 2007). Desafortunadamente, ninguna de las quimeras de clase V fueron funcionales, por lo que si estas proteínas realmente poseen actividad catalítica es algo que todavía queda por demostrar.

### **Propiedades biológicas de las quimeras**

Con el objetivo de analizar la naturaleza del centro catalítico de las quimeras y las propiedades de la quitina sintetizada por las mismas, ensayamos su sensibilidad tanto *in vitro* como *in vivo* frente a distintos inhibidores de la síntesis de quitina. Cabe destacar el hecho de que las enzimas de clase IV mostraran distinta sensibilidad *in vitro* a los inhibidores de la síntesis de quitina nikomicina Z y polioxina D. Y más importante aún, que dichas diferencias se tradujeran en distinta susceptibilidad *in vivo*. Por tanto, la construcción de quimeras y su expresión en *S. cerevisiae* podría ser una aproximación sencilla para chequear la sensibilidad a inhibidores específicos de la síntesis de quitina sin la interferencia de otras actividades QS.

Por otra parte, detectamos una relación directa entre la cantidad de quitina que las distintas quimeras son capaces de sintetizar y su resistencia a caspofungina, un inhibidor de la síntesis de  $\beta(1,3)$ -glucano. Este resultado sugiere un posible efecto sinérgico del uso combinado de inhibidores de la síntesis de ambos polímeros, lo cual podría ser una nueva terapia a explorar frente a cepas de *C. albicans* resistentes a caspofungina (Lee et al., 2011). Nuestros resultados además resaltan el papel clave que juega la quitina en la arquitectura de la PC, y que por tanto, refuerza a la actividad QSIII como una diana potencial frente a la que diseñar antifúngicos.

Además, y en línea más acorde con el planteamiento general de esta tesis, las quimeras nos han permitido estudiar el papel que juega el dominio central de la QSIII en su tráfico intracelular.



Contents lists available at ScienceDirect

## Fungal Genetics and Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yfgbi](http://www.elsevier.com/locate/yfgbi)

## Amino acid divergence between the *CHS* domain contributes to the different intracellular behaviour of Family II fungal chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*

Cristina Jimenez<sup>a,1</sup>, Carlos Sacristan<sup>a,1</sup>, M. Isabel G. Roncero<sup>b</sup>, Cesar Roncero<sup>a,\*</sup><sup>a</sup>Instituto de Microbiología Bioquímica and Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain<sup>b</sup>Departamento de Genética, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 27 April 2010

Accepted 30 August 2010

Available online 9 September 2010

## Keywords:

Cell wall

Chitin synthase

Heterologous expression

Antifungal

## ABSTRACT

Family II chitin synthases (CS), including classes IV and V enzymes, share conserved catalytic domains flanked by transmembrane regions. Here we addressed the characterization of Family II fungal CSs by heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Full-length CSs from classes V or IV were not functional when expressed in *S. cerevisiae* and accumulated in different intracellular compartments. However, the exchange between different class IV, but not of class V, *CHS* domains resulted in functional proteins both *in vivo* and *in vitro*. The different domains afford the chimeric proteins distinct intracellular behaviours, ranging from endoplasmic reticulum retention to reduced endocytic turnover at the plasma membrane. These results allow a role in chitin synthesis to be assigned to all class IV enzymes, but they also highlight the involvement of the intracellular globular domain of these CSs, not only in enzymatic activity but also in the regulation of their intracellular turnover.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chitin is a  $\beta$ 1,4-linked polymer of N-acetylglucosamine (GlcNAc) that is present in diverse organisms, including fungi, insects, and nematodes. Chitin synthases (CS) are highly variable proteins, containing a relatively well conserved catalytic domain bordered by transmembrane regions (TMs) (Roncero, 2002; Ruiz-Herrera et al., 2002; Tellam et al., 2000). Phylogenetic analyses have found support for the existence of two major families (or divisions) of CSs (Roncero, 2002; Ruiz-Herrera et al., 2002). Regardless of their sequence divergence (Fig. 1A), the members of both families are structurally different. All members of Family II, including fungal classes IV and V CSs, present the chitin synthase domain flanked by transmembrane regions, which afford them a secondary structure (Fig. 1B) that is clearly different from all the members of Family I described so far. These latter would anchor to the PM through a single C-terminal region containing multiple TM helices (Tellam et al., 2000).

In fungi, the number of the *CHS* genes described per organism varies considerably, and the functions of many of the CS activities

encoded by these genes remain unknown. In *Saccharomyces cerevisiae* the different pools of chitin are produced by three specialized chitin synthases (CSI to CSIII) that differ in their optimum pH, cation dependence, zymogenic behaviour, and susceptibility to inhibitors (reviewed in Roncero, 2002). CSI acts as a repair enzyme at the time of cytokinesis; CSII synthesizes the chitin in the primary septum that separates mother and daughter cells. CSIII, a class IV enzyme that is the only Division II CS in yeast, is responsible for the bulk of cellular chitin, including the chitin present along the lateral cell wall and the chitin ring formed at the base of an emerging bud. The regulation of CSIII is complex, since the arrival of Chs3p, its catalytic subunit, to the PM requires several accessory proteins for its activation, trafficking, or both. Chs7p is required for the exit of Chs3p from the endoplasmic reticulum (Trilla et al., 1999). Chs5/6p mediates its correct trafficking through the Golgi apparatus (Trautwein et al., 2006), and Chs4p mediates the translocation of Chs3p into the PM in an active form (Reyes et al., 2007), a biological role assumed by Shc1p during sporulation (Sanz et al., 2002). Chs7p and Chs4p are synthesized in limiting amounts in wild type (wt) cells, and hence the overexpression of Chs3p leads to its accumulation in the ER (Trilla et al., 1999). Similarly, only the overexpression of Chs4p increases the translocation of Chs3p into the PM (Reyes et al., 2007). The coordinated overexpression of Chs3p, Chs4p and Chs7p elicits a significant increase in CSIII levels (Trilla et al., 1999), but not in chitin synthesis, owing to metabolic constraints imposed by the levels of Gfa1p (Gomez et al., 2009; Lagorce et al., 2002). All the experimental evidence gathered

\* Corresponding author. Address: Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Edificio Departamental, R-219, Avda., Campo Charro s/n, 37007-Salamanca, Spain. Fax: +34 923 224876.

E-mail address: [crm@usal.es](mailto:crm@usal.es) (C. Roncero).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.



*EhCHS1* gene has been expressed in *S. cerevisiae* (Van Dellen et al., 2006). The protein encoded is highly divergent from fungal CSs, but contains a *CHS* domain similar to those of fungal Division II enzymes flanked by TM regions. When overexpressed in *S. cerevisiae*, the *EhCHS1* gene produces a CS activity with distinct characteristics that promotes chitin synthesis over the cell surface. Although this result is difficult to extrapolate to fungal CSs owing to the sequence peculiarities of this CS, this was a promising starting point for the heterologous expression of fungal CS from classes IV and V in yeast; the main goal of this work.

Here we show that the heterologous expression of fungal CSs of Division II does not produce functional proteins in yeast owing to their incorrect intracellular trafficking. Moreover, the exchange of the *CHS* domain of a class IV enzyme for a class V domain does not produce a functional protein either. Even the exchange between catalytic domains of class IV from different origins produces only partially functional proteins. All these results highlight the extremely complex structural nature of class IV CSs and the specialized machinery involved in their intracellular transport to the PM.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Strains, plasmids and growth conditions

We used the *S. cerevisiae* CRM103 (W303  $\alpha$  *chs3A::URA3*) and CRM873 (W303  $\alpha$  *chs3A::LEU2*) strains and the corresponding wt strain (W303) throughout this work. These strains were transformed with plasmids containing the chimeric *CHS* genes and, where indicated, with the pRS425-*ScCHS7* and pRS423-*ScCHS4* plasmids. These plasmids were obtained by subcloning the complete open reading frames (ORFs) from previous constructs (Trilla et al., 1999) in the indicated vectors. For simplicity, throughout the text plasmids containing the chimeric *CHS* are referred to with the name of the gene used for the replacement (see below). We used the original pRS424-*ScCHS3* as a control for all the experiments. Unless otherwise indicated, all experiments were performed in SD media with the corresponding supplements.

### 2.2. Plasmid construction

The plasmids containing the different fungal *CHS* genes were made as follows. The *FoCHSV* gene was cloned as a functional cDNA (Madrid et al., 2003) under the control of the *GAL1* promoter in plasmid pRS426-*pGAL1-CYC1* (Mumberg et al., 1994). *CaCHS3* was amplified from genomic DNA by PCR in different fragments, which were fully sequenced. The complete ORF was reassembled in several subcloning steps and later cloned under the control of the *GAL1* promoter in the pRS426-*pGAL1-CYC1* plasmid (Mumberg et al., 1994). Appropriate expression of these genes was achieved by transferring the yeast cells to 2% galactose media.

Chimeras were constructed by replacing an internal fragment of *ScCHS3* cloned in the pRS424 vector by homologous recombination *in vivo*. A 300 bp fragment was replaced by the corresponding regions of the class V chitin synthases *AfCHSE* and *FoCHSV* (small (S) chimeras) or, alternatively, a 900 bp fragment by regions from the class IV genes *CaCHS3*, *AfCHSF*, *CnCHS1* and *CnCHS3* (Fig. 1C). Heterologous PCR fragments were amplified using 70–75 nucleotide-long primers designed with their first 50 nucleotides homologous to the distal sequence of the region of *ScCHS3* to be replaced, and the remaining 18–21 nucleotides, homologous to the *CHS* template DNA to be amplified. PCR was carried out using between 25 to 35 cycles, depending on the source of the gene: plasmid or genomic DNA respectively. The amplified fragments were purified and checked to be correct by restriction analysis. The pRS424 plasmid carrying *ScCHS3* under the control of its own promoter (Trilla

et al., 1999) was linearized with *NdeI* (900 bp fragments) or *KpnI* (300 bp fragments) and was co-transformed into the CRM103 (*chs3A*) strain together with the different products of the heterologous PCR, allowing homologous recombination to occur *in vivo* (Muhlrad et al., 1992). The long stretch of homologous 50 bp would direct the homologous recombination *in vivo* with the linearized *ScCHS3*. The general strategy used is outlined in Fig. S1, together with the oligonucleotides used for amplification (see Supplementary material). The selection and characterization of tryptophan prototrophs indicated that more than 85% of transformants arose by homologous recombination with less than 15% originating by the recircularization of the linearized plasmid.  $\text{Trp}^+$  transformants were later tested for CFW staining. All the selected clones were confirmed by DNA sequencing after plasmid recovery in *Escherichia coli*.

Most of the heterologous proteins were later tagged with the GFP or 3xHA epitopes. To do so, the corresponding GFP or 3xHA epitopes were introduced in-phase as *NotI* fragments in a unique *NotI* site previously created by site-directed mutagenesis just before the termination codon of each gene, as described (Cos et al., 1998). When possible, we confirmed that the introduction of the tags had not altered the functionality of the proteins (not shown).

### 2.3. Drug sensitivity testing

#### 2.3.1. Agar plate drug resistance assays

Overnight cultures were diluted in water to an OD of 1.0, and serially diluted 1:10. Then, the different dilutions were spotted onto SC agar plates containing caspofungin and incubated at 28 °C for 72 h. Plates were prepared by adding caspofungin (Candidas, MSD) at different concentrations (from 5 to 50 ng/ml) to the molten agar. Calcofluor White (CFW) resistance was similarly determined in SC media buffered with 50 mM potassium hydrogen phthalate pH 6.3 (Cos et al., 1998).

#### 2.3.2. Liquid broth dilution assays

To quantify drug resistance, 1  $\mu$ l of a late stationary-phase broth culture was diluted in 150  $\mu$ l of SC broth containing caspofungin or polyoxin D at different concentrations in 96 well-microtiter plates. Plates were then incubated at 28 °C for 40 h, and growth in the presence or absence of the drugs was measured by reading turbidity every 2 h at 600 nm. Caspofungin and polyoxin D concentrations ranged from 10–250 ng/ml to 20–600  $\mu$ g/ml respectively.

### 2.4. Western blots

Yeast extracts were obtained as previously described (Reyes et al., 2007), quantified and fractionated in 7.5% SDS-polyacrylamide gel. After electrophoresis, proteins were transferred to an Immobilon-P membrane (Millipore), and incubated with rabbit polyclonal antibody against the last 21 amino acids of *ScChs3p* (C. Roncero, unpublished) or commercial mouse monoclonal antibodies against GFP (Clontech) or HA (12C5A, Roche diagnostic). Protein bands were visualized using the ECL kit (Amersham) and were quantified using a scanning densitometer (Biorad GS800) and Quantity One software.

### 2.5. Microscopy techniques

Active chitin synthesis was visualized by staining early logarithmically growing cells in YEPD medium with 50  $\mu$ g/ml CFW for 2 h at 28 °C. When required, staining with CFW was performed for only 45 min. All the pictures in the series were acquired under identical conditions and the images were processed in parallel to maintain relative intensities. Fluorescence microscopy of GFP constructs was performed directly, as described (Reyes et al., 2007), while the localization of the 3xHA tagged proteins was determined

by Immunofluorescence (IF) using a specific monoclonal anti-HA antibody (HA.11, Covance) (Trilla et al., 1999). Fluorescence was observed under a Leica microscope equipped with a Orca-ER digital camera. Occasionally, Z-stack images were collected through a DeltaVision microscope, using 0.05  $\mu\text{m}$  step sizes. These images were later deconvolved using Softworx™. The images of a deconvolved Z-stack were combined within a single frame using average projections. Images were processed using ImageJ software.

## 2.6. Membrane preparation and enzymatic assays

Cell membranes were isolated according to Choi and Cabib (Choi and Cabib, 1994). The enzymatic assay was performed with and without trypsin treatment and with the addition of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$  to the reaction mixture, which allows the specific measurement of CSIII activity. CSII activity was sometimes determined after trypsin treatment and omitting the addition of  $\text{Ni}^{2+}$  to the reaction mixture, as described (Choi and Cabib, 1994). Kinetic measurements were always performed in the absence of proteolytic activation and, when required, in the presence of different concentrations (25–350  $\mu\text{M}$ ) of nikkomycin Z and polyoxin D. The data presented are typically averages of at least three independent experiments.  $K_i$  values were determined at two different concentrations of the drugs at least.

## 2.7. Chitin determination

Chitin was determined enzymatically as described previously (Trilla et al., 1999), using chitinase and the colorimetric determination of GlcNAc.

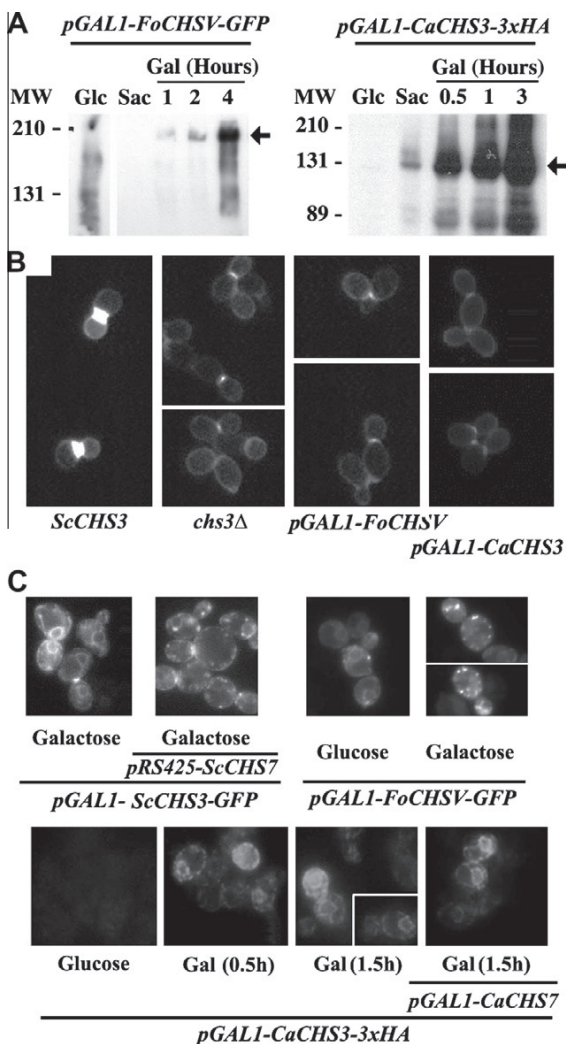
## 2.8. Statistical analyses

The results were evaluated statistically using analysis of variance (ANOVA) and Student's "t" test for unpaired data. The analyses were performed using the SPSS Statistics 17.0 software, and in all cases the borderline value of significance was 0.05. Values significantly different from the controls are indicated (#).

## 3. Results

### 3.1. The chitin synthases *FoChsVp* and *CaChs3p* are not functional in *S. cerevisiae*

The heterologous expression of proteins in *S. cerevisiae* has been a very useful tool in the characterization of enzymatic activities from genetically unapproachable systems. To express a fungal class V chitin synthase in *S. cerevisiae*, we first cloned a functional cDNA of *FoCHSV* (*Fusarium oxysporum*) (Madrid et al., 2003) under the control of the *GAL1* promoter in the multicopy yeast vector pRS424, either with or without the GFP in its C-terminal region (see Section 2). The resulting plasmids were transformed into the *S. cerevisiae chs3Δ* mutant (CRM873). Upon growth in galactose containing medium, the protein was expressed as a 210-kDa protein, in agreement with its expected size (Fig. 2A). The transformed strain was as resistant to CFW as the original *Scchs3Δ* (not shown), and the CFW staining was indistinguishable from that of the mutant (Fig. 2B). In addition, we created several N-terminal truncations of *FoCHSV* and expressed them in *S. cerevisiae*. All of them, including the one that completely lacked the MMD domain (Fig. 1B), were non-functional (not shown). Based on these results, we attempted to express a class IV enzyme from a more biologically related organism: *C. albicans*. The *CaChs3p* protein was structurally very similar to *ScChs3p* and showed a very high degree of identity (Fig. 1A and C). The *CaCHS3* ORF was cloned under the control of the *GAL1* pro-



**Fig. 2.** Heterologous expression of chitin synthases from classes IV and V in yeast. (A) Expression of the indicated proteins after induction with galactose during the indicated times. The Western blots shown were developed with the anti-GFP (Living Colours, Clontech) or anti-HA (12CA5, Boehringer) monoclonal antibodies. Arrows mark the proteins of interest. (B) CFW staining of *S. cerevisiae chs3Δ* cells transformed with the indicated plasmids. (C) Localization of the indicated proteins by direct visualization (GFP) or by indirect immunofluorescence (3xHA). All experiments were carried out in *Scchs3Δ* cells transformed with plasmids containing the *ScCHS3*, *FoCHSV* or *CaCHS3* genes under the control of the *GAL1* promoter. Genes were tagged as indicated in the figure. The induction of expression was performed in cells growing in 2% galactose medium. For timely induction, early logarithmic cell were transferred from sucrose containing medium to 2% galactose medium for the indicated times.

moter as above (see Section 2 for details) with or without a 3xHA tag in its C-terminal domain. The plasmid directed the expression of a protein of approximately 135 kDa in medium containing galactose (Fig. 2A). The strain expressing this protein was resistant to CFW and was not stained with the dye (Fig. 2B). We also measured the levels of CSIII activity in both classes V and IV transformants, and neither of them showed chitin synthase activity above the background levels of the *Scchs3Δ* mutant under the different conditions tested (not shown). Apparently, the heterologous expression of chitin synthases belonging to classes IV or V did not produce functional proteins in *S. cerevisiae*. Since the functionality of CSs requires their correct arrival at the PM, we looked at the intracellular localization of the heterologous proteins.



Expression of the *FoCHSV-GFP* construct in glucose medium led to retention of the GFP signal at the ER (Fig. 2C), probably because of the synthesis of aberrant proteins. Induction from the *GAL1* promoter released the fluorescence from the ER and promoted its accumulation at multiple intracellular spots (Fig. 2C). Although it is very difficult to establish the nature of these spots, the images suggest an accumulation of the protein within intracellular vesicles. Interestingly, the expression of *CaChs3p-3xHA* led to its complete retention at the ER (Fig. 2C). This retention was observed only 30 min after the induction and was not alleviated by the overexpression of *CaCHS7* (Fig. 2C) or *ScCHS7* (not shown). Under similar conditions the accumulation of *ScChs3p* at the ER is mostly relieved by *ScCHS7* overexpression (Fig. 2C and Trilla et al., 1999).

3.2. Class IV but not class V chimeric chitin synthases are functional in *S. cerevisiae*

We next focused on the construction of chimeric CSs using *ScChs3p* as a backbone. To this end, the region of *ScChs3p* located between amino acids 801 and 1112, which contains its catalytic domain (Fig. 1B), was replaced by the corresponding region from several fungal CSs belonging to classes IV and V. The identity along this region was above 61% between the different class IV enzymes and significantly lower (38%) between enzymes of classes IV and V (Fig. 1B and C). Constructions were made by homologous recombination *in vivo* (see Section 2 and Fig. S1 for details), and the functional chimeras were selected after CFW staining of the transformants (see Section 2). All the different class IV chimeras were functional, as assessed by significant CFW staining (not shown). In contrast, none of constructions containing the class V chimeras showed positive CFW staining (not shown). We then constructed shorter chimeras for the class V enzymes by replacing only the most conserved part; between the B and B' regions (47% identity, Fig. 1C). Again, none of the transformants obtained showed CFW staining different from that of the *Scchs3Δ* mutant, although they contained the expected chimeric CSs.

Based on these preliminary results we selected several chimeras for further studies: namely, the class IV chimeras obtained from

*CaCHS3*, *CnCHS1*, *CnCHS3* and *AfCHSF*, and the class V chimeras containing the smaller replacement from *FoCHSV* and *AfCHSE*. As controls, we used the original *ScCHS3* as a positive control and a class II chimera from *ScCHS2*, which showed less than 30% identity in this region and hence should behave as negative control. Henceforth, the chimeric proteins will be referred to with the name of the gene/protein providing their catalytic domains.

The multicopy plasmids containing these bona fide chimeras were retransformed in the *Scchs3Δ* mutant and in certain cases they were also transformed with the *pRS425-ScCHS7* plasmid; later we measured chitin levels in all these strains (Fig. 3A). The *CaChs3p* chimera strain showed similar levels of chitin to the *ScChs3p* control and no significant increase in chitin synthesis was promoted by the overexpression of *ScCHS7* in either case. The *AfChsFp* strain contained intermediate levels of chitin that were moderately increased after *ScCHS7* overexpression. The *CnChs1p* and *CnChs3p* strains showed reduced levels of chitin that were significantly increased upon *ScCHS7* overexpression. As expected from their CFW staining (not shown), all class V chimeras had chitin levels similar to those of the *Scchs3Δ* control mutant. CFW resistance was inversely proportional to the chitin content (Fig. 3B), class V chimeras being fully resistant (not shown). However, the partial resistance of the *CaChs3p* strain as compared to the control should be noted; this was most noticeable in the absence of *ScCHS7* overexpression. Taken together, all these results indicate that all the class IV chimeric protein were functional in *S. cerevisiae*, and that high levels of *ScChs7p* alleviated the low functionality of some of the chimeras.

Although all chimeric proteins shared the same promoter and had an identical backbone structure, a simple explanation for these results could be the differences in the accumulation of the different proteins. Thus, we determined the size and relative levels of these chimeric proteins (Fig. 4). Class IV chimeras (Fig. 4A) accumulated at higher levels than those of class V or *ScChs2p* (Fig. 4B), although all of them were present at higher levels than *ScChs3p* in the wt type strains, which was barely detectable with this antibody (Fig. 4A, wt lane). These data indicate that class V and *ScChs2p* chimeras were expressed in *S. cerevisiae*, despite their null functionality.

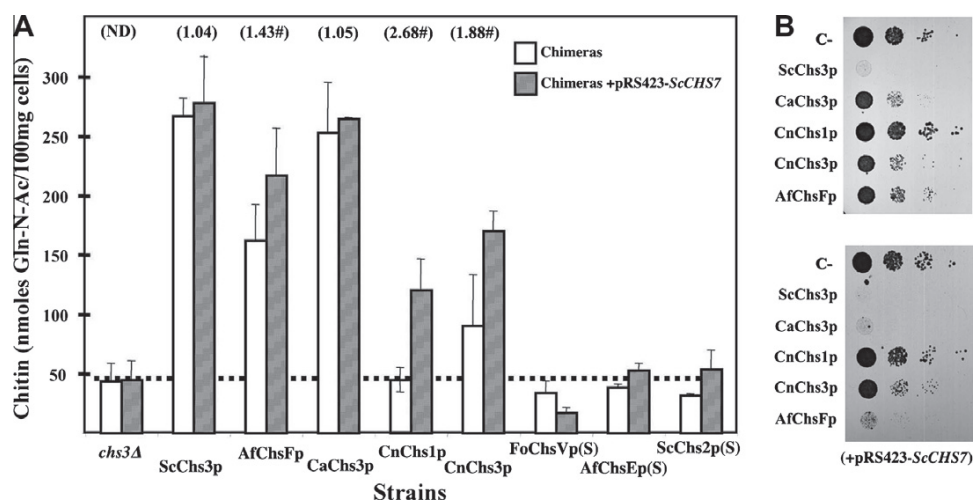
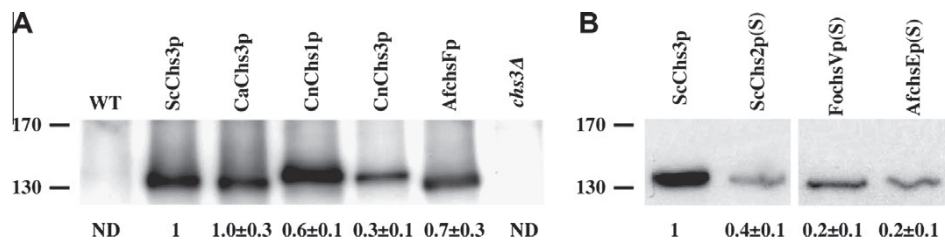


Fig. 3. Chitin synthesis in the indicated strains. (A) Chitin levels were measured in *Scchs3Δ* cells containing the indicated chimeras alone (white bars) or together with the *pRS423-ScCHS7* plasmid (dark bars). The figure shows the means of three independent experiments. Dotted line marks the amount of chitin in the original *Scchs3Δ* mutant. Numbers above the bars represent the increase in chitin levels after *ScCHS7* overexpression. Statistically significant increases are indicated (#). (B) Resistance to CFW (0.02 mg/ml) of the indicated strains without (upper panel) or with (lower panel) *pRS423-ScCHS7*.



**Fig. 4.** Relative levels of the different chimeric proteins as determined by Western blot using the polyclonal anti-Chs3p antibody. (A) Class IV and (B) class V chimeras. Numbers under the line represent the relative levels of each protein to ScChs3p using an internal loading control. The data presented are the means from the quantification of three independent Westerns.

### 3.3. The chimeric proteins of class IV are enzymatically active chitin synthases with distinct properties

Chitin synthesis in *S. cerevisiae* depends on multiple factors, including metabolic constraints (Lagorce et al., 2002). We therefore assessed the functionality of these proteins directly by measuring CSIII activity in the different strains (Table 1). CSIII activity can be measured with or without trypsin and both values provide different types of information. Basal levels of CSIII (w/o) are interpreted as being indicative of the amount of biologically functional CSIII that reaches the PM, while total levels (with) indicate the total amount of enzymatically active CSIII. All the class IV chimeras promoted CSIII activity significantly above background levels (*Scchs3Δ*), in agreement with the presence of chitin in their cells. None of the class V or ScChs2p chimeras showed CSIII activity above the background level (not shown), confirming that these proteins are not active either *in vivo* or *in vitro*.

All the class IV chimeras showed CSIII activity in the absence of *ScCHS7* overexpression (not shown), but we focused on the values after *ScCHS7* overexpression, when the chimeric proteins promoted higher levels of chitin synthesis (Fig. 3A). Under these conditions, overexpression of the endogenous ScChs3p protein led to a highly zymogenic CSIII (Table 1) due to the limiting amounts of Chs4p (Trilla et al., 1999). The simultaneous overexpression of *ScCHS4* and *ScCHS7* increased the basal activity, significantly reducing its zymogenicity (Table 1 and Trilla et al., 1999). However, the CaChs3p strain showed much higher basal CSIII activity than the wt after the overexpression of *ScCHS7*, being less zymogenic since the total amounts of CSIII were similar (Table 1). Apparently, CaChs3p chimeric activity is partially independent of Chs4p levels and, in agreement with this, overexpression of *ScCHS4* in this strain only increased its basal activity slightly. The rest of the chimeras showed reduced levels of CSIII activity, either with or without trypsin activation, but, more importantly, the overexpression of *ScCHS4* in these strains did not significantly alter the CSIII values, suggesting that under the conditions tested these CS chimeric proteins were less active.

**Table 1**  
CSIII activity promoted by chimaeric CS.

CS	pRS425- <i>ScCHS7</i>			pRS425- <i>ScCHS7</i> pRS423- <i>ScCHS4</i>		
	w/o	with	Act.	w/o	with	Act.
None	1.7 ± 0.2	6.3 ± 1.4	–		ND	
ScChs3p	18.6 ± 4.1	45.9 ± 10.4	× <b>2.47</b>	32.3 ± 3.7	45.6 ± 3.4	× <b>1.41</b>
AfchsFp	13.8 ± 3.9	18.5 ± 3.9	× <b>1.34</b>	16.0 ± 2.9	23.2 ± 5.0	× <b>1.45</b>
CaChs3p	33.2 ± 8.3	44.0 ± 7.6	× <b>1.32</b>	35.4 ± 3.1	37.8 ± 4.6	× <b>1.07</b>
CnChs1p	10.0 ± 0.6	14.9 ± 1.8	× <b>1.49</b>			ND
CnChs3p	8.2 ± 1.9	13.5 ± 4.2	× <b>1.65</b>	11.2 ± 2.9	14.9 ± 1.8	× <b>1.33</b>

CSIII activity was measured as described in the Section 2 with and without trypsin treatment. Values are expressed as nmoles of NAcGln incorporated/mg of protein and hour. The level of the increase in activity after trypsin treatment is indicated in bold face. Values were determined in the *chs3Δ* strain containing the indicated chimaeras in the pRS424 plasmid. These strains additionally contained the indicated plasmids. Data are the means of at least three independent experiments.

It was unclear whether these differences could be translated into different kinetic properties and hence we characterized these CS activities in greater detail. The apparent  $k_m$  values were similar for all CSs except for AfChsFp, which showed an apparent  $k_m$  three times higher than the wt (Table 2). Nikkomycin Z and polyoxin D have been reported to be competitive inhibitors of several CS activities (Cabib, 1991; Gaughran et al., 1994), and they are therefore expected to interact with the catalytic domain of these proteins, which is partially different among the chimeras (Fig. 1). In this sense, we detected significant differences in the  $K_i$  for these drugs. The CaChs3p chimera was more sensitive to nikkomycin Z than any other, while AfChsFp and both *Cryptococcus* chimeras were less sensitive than the endogenous CSIII. Polyoxin D afforded rather different results, since the most sensitive activity was found for AfChsFp, in this case CaChs3p being less sensitive. Taken together, these results strongly suggest that the sequence differences in the replaced domain are translated into differential catalytic properties of the enzymes, most appreciable using specific competitive inhibitors.

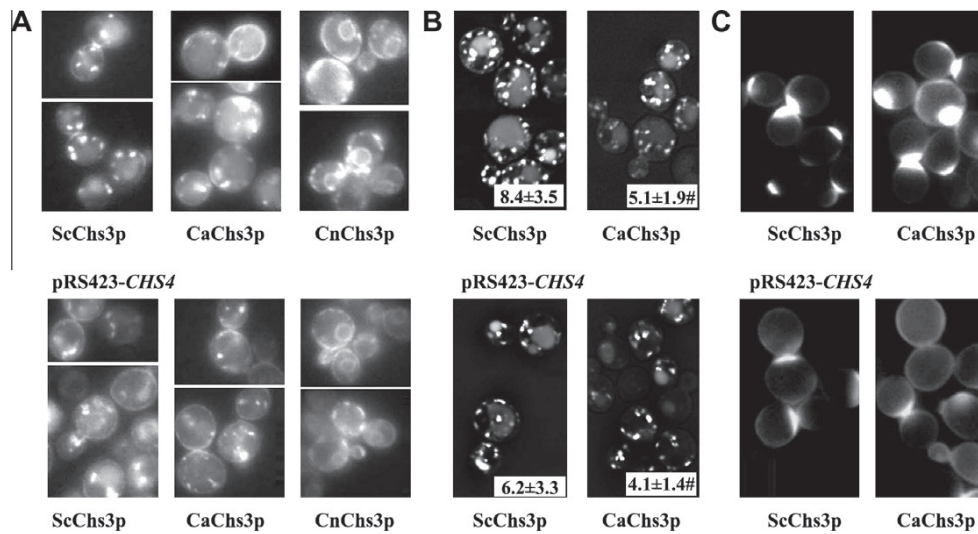
### 3.4. Different intracellular behaviour of the CSIII chimeras

A somewhat puzzling result was the higher basal levels of CSIII in the CaChs3p chimera, despite its showing catalytic properties

**Table 2**  
Kinetic characteristics of the heterologous CSIII.

$k_m$ (mM)	$K_i$ (μM)	
	NikZ	PoID
ScChs3p	0.62 ± 0.12	6.28 ± 1.01
AfchsFp	2.01 ± 0.92#	12.76 ± 4.90#
CaChs3p	0.88 ± 0.46	3.71 ± 0.80#
CnChs1p	0.45 ± 0.16	10.67 ± 0.63#
CnChs3p	0.57 ± 0.07	12.64 ± 4.12#

$k_m$  values were determined using the Lineweaver–Burk plot method.  $K_i$  values were calculated from  $k_m$  values determined using at least two different concentrations of the inhibitors. Values significantly different from control ( $p < 0.05$ ) are indicated (#).



**Fig. 5.** Localization of different CS chimeras. (A) Localization of ScChs3-GFP, CaChs3p-GFP and CnChs3p-GFP. Images were acquired as single focal planes with a DeltaVision microscope. (B) Average projections of deconvoluted Z-stacks. Numerical values indicate the average numbers of intracellular spots per cell ( $n > 30$ ). Statistically significant differences are indicated (#). (C) CFW staining of some of the strains shown in A. Paired images were processed identically. Note the redistribution of the staining along the cell surface in the cells containing the CaChs3p chimera. All the strains used in the figure contained the pRS425-ScChs7 and the corresponding pRS424 with the chimeric construct. Lower row images are from strains that also overexpress ScChs4 from the indicated plasmid.

similar to the wt. This suggests higher functional amounts of the chimeric enzyme. After ScChs7 overexpression, the ScChs3-GFP control protein localized correctly at the neck, but it also accumulated heavily in intracellular vesicles (Fig. 5A). In contrast, the CaChs3-GFP chimera appeared partially distributed along the PM, showing less accumulation in the cytoplasm (Fig. 5A). Direct quantification of the total number of intracellular vesicles by analysis of Z-stacks confirmed the initial observations, indicating that the number of intracellular vesicles in the strain containing ScChs3-GFP was significantly higher than in that with the CaChs3-GFP chimera (Fig. 5B). This accumulation would agree with the limiting amounts of ScChs4p after an excess of ScChs3p (Reyes et al., 2007). We therefore overexpressed ScChs4 in the same strains. Overexpression of ScChs4 clearly reduced the cytoplasmic spots in both strains (Fig. 5A and B, lower panels) but also led to a partial redistribution of both proteins along the PM (Fig. 5A, lower panels), although these effects were always much more apparent for ScChs3-GFP. Accordingly to that, CaChs3p chimera promoted a partial delocalization of chitin as assessed by calcofluor staining (Fig. 5C). These results are fully compatible with a higher accumulation of the CaChs3p chimera at the PM. Under similar conditions the CnChs3p-GFP chimera was retained in the ER (Fig. 5A), thus explaining the reduced functionality of this chimera.

**3.5. The role of CSIII chimeras in the sensitivity to drugs affecting the assembly of the yeast cell wall**

A practical way of confirming the biological functionality of the chimeras described was to test the sensitivity of the strains containing the different proteins to different antifungal agents. Caspofungin (Cancidas) is an inhibitor of  $\beta$ -glucan synthesis with therapeutic use, whose sensitivity has been indirectly linked to chitin synthesis deregulation (Walker et al., 2008). *S. cerevisiae* mutants lacking CSIII are hypersensitive to this drug (Markovich et al., 2004) and the *S. cerevisiae chs3Δ* strains grew poorly at 16 ng/ml of caspofungin (Fig. 6A). All strains with the non-functional chimeras, including all class V chimeras, behaved in exactly the same way as the ScChs3Δ mutant (Fig. 6A and data not shown). The strains containing the functional chimeras CaChs3p and AfChsFp were resis-

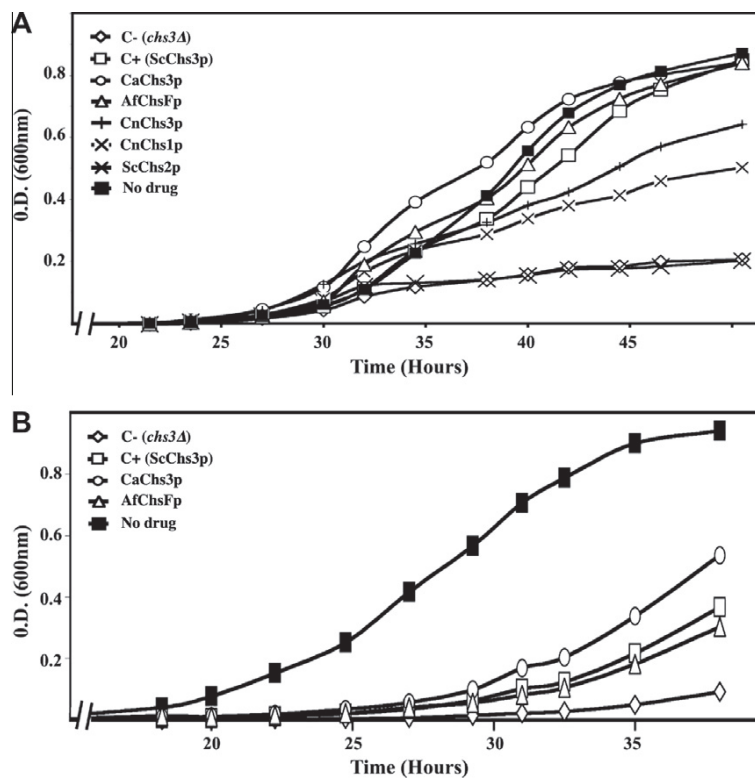
tant to the drug at this concentration, behaving similarly to the strain containing endogenous ScChs3p and the wt (Fig. 6A), with very similar generation times ( $130.0 \pm 8.4$  min) in the presence of caspofungin. The expression of the *Cryptococcus* chimeras, CnChs1p or CnChs3p, only conferred partial resistance to caspofungin, the strain containing the CnChs3p chimera growing better. At 32 ng/ml of caspofungin, all the strains grew poorly but the AfChsFp strain had double the generation time than the ScChs3p or CaChs3p strains (not shown), thus showing some degree of hypersensitivity. Therefore, there is a perfect correlation between chitin amounts and caspofungin resistance, reinforcing the role of chitin as an essential component of yeast cell walls after the inhibition of  $\beta$ -glucan synthesis.

We also tested the effect *in vivo* of some chitin synthase inhibitors. Unfortunately we were unable to significantly inhibit the growth of *S. cerevisiae* using nikkomycin Z (Gaughran et al., 1994), although inhibition with polyoxin D afforded reliable results (Fig. 6B). *S. cerevisiae* was sensitive to 600  $\mu$ g/ml of polyoxin D, and this sensitivity was increased in the presence of caspofungin (not shown), as reported (Walker et al., 2008). All the mutants lacking a functional CSIII activity were unable to grow in 600  $\mu$ g/ml polyoxin D (Fig. 6B and data not shown), but the ScChs3Δ null strains containing the ScChs3p, CaChs3p and AfChsFp chimeras grew to a limited extent at this drug concentration (Fig. 6B). Interestingly, the CaChs3p chimera strain showed better growth than the ScChs3p strain, which grew better than the AfChsFp strain (Fig. 6B), in perfect correlation with the sensitivity of these CSs to polyoxin D *in vitro* (Table 2). Apparently, a higher  $K_i$  *in vitro* for a specific CSIII is translated in a lower sensitivity to the drug *in vivo*.

**4. Discussion**

**4.1. Structural differences between CS classes IV and V determine their different intracellular behaviour**

The full-length classes IV and V CSs expressed heterologously in *S. cerevisiae* were not functional, despite their confirmed expression from the ScGAL1 promoter. CaChs3p accumulated in the ER,



**Fig. 6.** Sensitivity of different strains to antifungal agents. (A) Sensitivity of strains containing the different chimeras to 16 ng/ml of caspofungin. (B) Sensitivity of strains containing the indicated chimera to 600 µg/ml of polyoxin D. No drug indicates the average growth in the absence of the drugs.

similar to ScChs3p in a *Scchs7Δ* mutant (Trilla et al., 1999). This accumulation was unlikely to have been linked to its excessive over-production of the protein since it occurred shortly after galactose induction, and it was not relieved after overexpression of *ScCHS7* (Fig. 2C). ScChs7p acts as a chaperone, assisting in the correct folding of ScChs3p for its loading into COPII vesicles (Kota and Ljungdahl, 2005), a process that also depends on the palmitoylation of ScChs3p (Lam et al., 2006). Interestingly, there is no cross-complementation between ScChs7p and CaChs7p despite their similarity at the protein level (Sanz et al., 2005). It is therefore expected that CSIII function would depend on very precise interactions of Chs3p at the ER, such interactions not necessarily being evolutionarily conserved between *S. cerevisiae* and *C. albicans*. During the preparation of this manuscript, the functional expression of the *Paracoccidiodes brasiliensis* CHS3 in *S. cerevisiae* has been reported (Barreto et al., 2010). Unfortunately, the results reported do not confirm the functional complementation of the *Scchs3Δ* mutant. Regardless of technical considerations, it is possible that PbChs3p might be exported more efficiently from the ER than CaChs3p owing to their different intracellular domains. Interestingly, FoChsVp did not accumulate in the ER even in the absence of ScChs7p (not shown), indicating that class V enzymes exit from the ER independently from Chs7p (Martín-Urdíroz et al., 2004). FoChsVp did not reach the PM, probably because the requirement of class V enzymes for specific mechanisms of polarized delivery associated with mycelial growth (Riquelme et al., 2007). Together, these results support the existence of independent mechanisms for the export of classes IV and V CSs from the ER (see below).

The class V chimeras were not functional, either *in vivo* or *in vitro*. Interestingly, the characterization of mutants in these proteins in different fungi has failed to link them unequivocally to chi-

tin synthesis, either *in vivo* or *in vitro*. It therefore remains to be shown that the CSs of class V are able to synthesize chitin. Alternatively, it is possible that the catalytic domain of the CS of class V could be different, conferring a different type of activity that was not testable under our experimental conditions. The biological function of class IV enzymes seemed to be more conserved, and all the chimeric proteins of this class were functional *in vivo* and *in vitro*. These results allowed us to attribute chitin synthase activity to CnChs1p and AfChsFp, two proteins whose biological function has not yet been reported. This is highly significant for filamentous fungi, where all the class IV CS mutants described lack biologically relevant phenotypes (Latge, 2007).

#### 4.2. The distinct intracellular behaviour of the class IV chimeras

Cells expressing endogenous ScChs3p and the chimeric CaChs3p behaved similarly, CSIII activity being fully functional in both cases without the overexpression of *ScCHS7*. However, the overexpression of ScChs3p required the simultaneous overexpression of *ScCHS7* in order for the excess of ScChs3p to be released from the ER (Trilla et al., 1999). This increased the total amount of CSIII activity by 2–3-fold (data not shown, and Trilla et al., 1999) producing a highly zymogenic CSIII. This zymogenicity was reduced after the overexpression of *ScCHS4* (Table 1, and Trilla et al., 1999). The basal CSIII activity promoted by the CaChs3p chimera was more than twice as high as in the ScChs3p strain, suggesting that the CaChs3p chimera would be activated more efficiently by the limited amounts of endogenous ScChs4p. Were this so, the chimera should behave like the wt after *ScCHS4* overexpression, conditions under which chitin synthesis is partially delocalized (Reyes et al., 2007). This was the case, with CaChs3p partially distributed

along the PM and chitin partially redistributed across the cell surface (Fig. 5A and C).

Taken together, these results highlighted a stronger accumulation of the CaChs3p chimera at the PM, fully compatible with its lower accumulation in intracellular vesicles as compared to ScChs3p (Fig. 5A and B). These vesicles are endocytically derived, since most disappeared after Latrunculin A treatment (not shown). It therefore seems that CaChs3p has a lower endocytic turnover than ScChs3p. In agreement with this, it has been shown that a blockade of endocytosis redistributes ScChs3p (Holthuis et al., 1998) and chitin synthesis (Reyes et al., 2007; Rockwell et al., 2009), also increasing basal CSIII levels (C. Roncero, unpublished); all these phenotypes were observed in the strain containing the CaChs3p chimera. In addition, the delocalization of chitin synthesis promoted by the CaChs3p chimera would explain its partial resistance to CFW (Fig. 3B) despite its wt chitin levels, similarly to what occurs in the *Scbni4A* mutant (Sanz et al., 2004). It is currently unclear whether the accumulation of the CaChs3p chimera at the PM is caused by a stronger action of ScChs4p on CaChs3p than on ScChs3p, or is due to structural differences between both proteins. However, the ScChs3p region apparently involved in its interaction with ScChs4p is contained in its first 700 amino acids (data not shown and DeMarini et al., 1997), which are identical between both proteins, thus favouring the second hypothesis. In addition, a direct comparison between CaChs3p and ScChs3p in the replaced region indicates that many of the divergent amino acids are putative substrates for posttranslational modification, including potential phosphorylation or ubiquitinylation sites. Changes in any of them could directly affect the endocytic turnover of the protein, either directly or altering its interaction with other proteins.

A rather different story emerges for the chimeras AfChsFp, CnChs3p and CnChs1p, whose participation in chitin synthesis was significantly increased after *ScCHS7* overexpression. As can be inferred from the CnChs3p results (Fig. 5A), these chimeric proteins were predominantly retained at the ER, even after *ScCHS7* overexpression, explaining their reduced biological functionality. It is also possible that the evolutionary divergence of these chimeras (Fig. 1A) could have altered their dependence on divalent cations or pH, reducing their activity and functionality in yeast.

Our work confirms previous phenotypic characterizations that have indicated that *CHS* genes belonging to classes IV and V encoded rather different CS proteins, despite the high degree of conservation between their *CHS* domains (Weber et al., 2006). In accordance with their sequence divergence, the differences uncovered among class IV enzymes are significant, affecting their intracellular transport. Interestingly, the differences described here were seen to be located in a globular region, suggesting that the proper folding of this region is necessary for the correct interaction of these proteins with the molecular machinery involved in ER export.

#### 4.3. Biological properties of CS chimeras

The sequence divergence between the *CHS* domains of the different class IV CSs is translated in the different sensitivity of the chimeras to specific inhibitors of chitin synthases (Table 2), and more importantly these differences are apparently translated into different susceptibility *in vivo* to the same inhibitors (Fig. 6B). Unfortunately, *in vivo* sensitivity to the different antifungal agents depends on multiple, highly complex factors. Our work thus provides an amenable way to test the sensitivity of different fungal class IV CS to specific CS inhibitors without the interference of other CS activities.

Interestingly, chitin synthesis is not only the direct target of chitin synthase inhibitors but it is also linked to different degrees of susceptibility to  $\beta(1-3)$ glucan synthase inhibitors such as caspo-

fungin (Markovich et al., 2004; Walker et al., 2008). Our work clearly establishes a direct correlation between the CSIII-dependent chitin content and caspofungin sensitivity, regardless of the indirect effect produced by the activation of the CWI response (Plaine et al., 2008; Walker et al., 2008). Thus, our results highlight the critical and direct role of chitin as a scaffold in the correct assembly of the *S. cerevisiae* cell wall. Contrary to what occurs in the case of CFW (see above), neither the strain containing the CaChs3p chimera (Fig. 6A) nor the *Scbni4A* mutant (Lesage et al., 2004) is hypersensitive to caspofungin, suggesting that the total amount of chitin is more important than its specific localization, which is altered in these strains. Taken together, the results reported here reinforce the possibility of CSIII being a candidate antifungal target; a somewhat unpopular hypothesis owing to the marginal phenotypic defects associated with the absence of class IV CSs in most fungi.

#### Acknowledgments

We thank Y. Sanchez for her thorough revision of the manuscript, N. Skinner for language revision and R. Valle for her technical support in this work. C.J and C.S. were supported by Predoctoral fellowships from the MEC. This research was supported by the Spanish CICYT grant BIO2007-60779 and the STREPWALL EU grant. Partial support from the JCyL through grants SA127A08 and GR231 is also acknowledged.

#### Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.fgb.2010.08.013.

#### References

- Au-Young, J., Robbins, P.W., 1990. Isolation of a chitin synthase gene (*CHS1*) from *Candida albicans* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Microbiol. 4, 197–207.
- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., Lodge, J.K., 2005. A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Eukaryot. Cell 4, 1902–1912.
- Barreto, L., Sorais, F., Salazar, V., San-Blas, G., Niño-Vega, G.A., 2010. Expression of *Paracoccidioides brasiliensis* *CHS3* in a *Saccharomyces cerevisiae* *chs3* null mutant demonstrates its functionality as a chitin synthase gene. Yeast 27, 293–300.
- Cabib, E., 1991. Differential inhibition of chitin synthases 1 and 2 from *Saccharomyces cerevisiae* by polyoxin D and nikkomycins. Antimicrob. Agents Chemother. 35, 170–173.
- Choi, W.J., Cabib, E., 1994. The use of divalent cations and pH for the determination of specific chitin synthases. Anal. Biochem. 219, 368–372.
- Cos, T., Ford, R.A., Trilla, J.A., Duran, A., Cabib, E., Roncero, C., 1998. Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. Eur. J. Biochem. 256, 419–426.
- DeMarini, D.J., Adams, A.E.M., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J.S., Pringle, J.R., 1997. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J. Cell Biol. 139, 75–93.
- Gaughran, J.P., Lai, M.H., Kirsch, D.P., Silverman, S.J., 1994. Nikkomycin Z is a specific inhibitor of *Saccharomyces cerevisiae* chitin synthase isozyme Chs3 *in vitro* and *in vivo*. J. Bacteriol. 176, 5857–5860.
- Gomez, A., Perez, J., Reyes, A., Duran, A., Roncero, C., 2009. Slt2 and Rim101 contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryot. Cell 8, 1449–1559.
- Holthuis, J.C., Nichols, B.J., Pelham, H.R., 1998. The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. Mol. Cell Biol. 9, 3383–3397.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A., Takagi, M., 1999. Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. J. Bacteriol. 181, 3721.
- Kota, J., Ljungdahl, P.O., 2005. Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. J. Cell Biol. 168, 79–88.
- Lagorce, A., Le Berre-Anton, V., Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Francois, J., 2002. Involvement of GFA1, which encodes glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. Eur. J. Biochem. 269, 1697–1707.

- Lam, K.K., Davey, M., Sun, B., Roth, A.F., Davis, N.G., Conibear, E., 2006. Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* 174, 19–25.
- Latge, J.P., 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* 66, 279–290.
- Lesage, G., Sdicu, A.M., Menard, P., Shapiro, J., Hussein, S., Bussey, H., 2004. Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics* 167, 35–49.
- Madrid, M.P., Di Pietro, A., Roncero, M.I., 2003. Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* 47, 257–266.
- Markovich, S., Yekutieli, A., Shalit, I., Shadkchan, Y., Oshero, N., 2004. Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3871–3876.
- Martin-Urdiroz, M., Madrid, M.P., Roncero, M.I., 2004. Role of chitin synthase genes in *Fusarium oxysporum*. *Microbiology* 150, 3175–3187.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A., Takagi, M., 1997. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation. *Mol. Gen. Genet.* 253, 520–528.
- Muhlrad, D., Hunter, R., Parker, R., 1992. A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast* 8, 79–82.
- Mumberg, D., Muller, R., Funk, M., 1994. Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acid Res.* 22, 5767–5768.
- Munro, C.A., Gow, N.A.R., 2001. Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med. Mycol.* 39 (Suppl. 1), 41–53.
- Plaine, A., Walker, L., Da Costa, G., Mora-Montes, H.M., McKinnon, A., Gow, N.A., Gaillardin, C., Munro, C.A., Richard, M.L., 2008. Functional analysis of *Candida albicans* GPI-anchored proteins: roles in cell wall integrity and caspofungin sensitivity. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1014–1040.
- 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.
- Riquelme, M., Bartnicki-García, S., González-Prieto, J.M., Sánchez-León, E., Verdín-Ramos, J.A., Beltrán-Aguilar, A., Freitag, M., 2007. Spitzenkörper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* 6, 1853–1864.
- Rockwell, N.C., Wolfger, H., Kuchler, K., Thorner, J., 2009. ABC transporter Pdr10 regulates the membrane microenvironment of Pdr12 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Membr. Biol.* 229, 27–52.
- Roncero, C., 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* 41, 367–378.
- Ruiz-Herrera, J., González-Prieto, J.M., Ruiz-Medrano, R., 2002. Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 1, 247–256.
- Sanz, M., Carrano, L., Jimenez, C., Candiani, G., Trilla, J.A., Duran, A., Roncero, C., 2005. *Candida albicans* strains deficient in *CHS7*, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology* 151, 2623–2636.
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A., Roncero, C., 2004. *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology* 150, 3229–3241.
- Sanz, M., Trilla, J.A., Duran, A., Roncero, C., 2002. Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Mol. Microbiol.* 43, 1183–1195.
- Specht, C.A., Liu, Y., Robbins, P.W., Bulawa, C.E., Iartchouk, N., Winter, K.R., Riggle, P.J., Rhodes, J.C., Dodge, C.L., Culp, D.W., Borgia, P.T., 1996. The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet. Biol.* 20, 153–167.
- Sudoh, M., Tatsuno, K., Ono, N., Chibana, H., Yamada-Okabe, H., Arisawa, M., 1999. The *Candida albicans* *CHS4* gene complements a *Saccharomyces cerevisiae* *skt5/chs4* mutation and is involved in chitin biosynthesis. *Microbiology* 145, 1613–1622.
- Sudoh, M., Yamazaki, T., Masubuchi, K., Taniguchi, M., Shimma, N., Arisawa, M., Yamada-Okabe, H., 2000. Identification of a novel inhibitor specific to the fungal chitin synthase. Inhibition of chitin synthase 1 arrests the cell growth, but inhibition of chitin synthase 1 and 2 is lethal in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 275, 32901–32905.
- Takeshita, N., Ohta, A., Horiuchi, H., 2005. CsmA, a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain, is localized through direct interaction with the actin cytoskeleton in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* 16, 1961–1970.
- Tatsuno, K., Yamada-Okabe, H., Takagi, M., Arisawa, M., Sudoh, M., 1997. Properties of yeast expressed *Aspergillus nidulans* chitin synthase B which is essential for hyphal growth. *FEMS Microbiol. Lett.* 149, 279–284.
- Tellam, R.L., Vuocolo, T., Johnson, S.E., Jarmey, J., Pearson, R.D., 2000. Insect chitin synthase cDNA sequence, gene organization and expression. *Eur. J. Biochem.* 267, 6025–6043.
- 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, J.A., Duran, A., Roncero, C., 1999. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 145, 1153–1163.
- Van Dellen, K.L., Bulik, D.A., Specht, C.A., Robbins, P.W., Samuelson, J.C., 2006. Heterologous expression of an *Entamoeba histolytica* chitin synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 203–206.
- Walker, L.A., Munro, C.A., de Bruijn, I., Lenardon, M.D., McKinnon, A., Gow, N.A., 2008. Stimulation of chitin synthesis rescues *Candida albicans* from echinocandins. *PLoS Pathog* 4, e1000040.
- Wang, Z., Szaniszló, P.J., 2002. Characterization of WdChs3p, a class III chitin synthase, of *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*, overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Med. Mycol.* 40, 283–289.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E., Steinberg, G., 2006. Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18, 225–242.

# CAPÍTULO 2

**EL CONTROL DE LA DIMERIZACIÓN DE CHS3 EN  
EL APARATO DE GOLGI Y SU FUNCIÓN EN EL  
RECICLAJE ENDOCÍTICO DE LA PROTEÍNA**

---





## ANTECEDENTES

Chs3 es una proteína compleja en múltiples aspectos. En primer lugar constituye un caso excepcional dentro del proteoma de la levadura en cuanto a la cantidad de recursos que le dedica la célula para asegurar su correcto tránsito a lo largo de la ruta de secreción. La segunda característica que llama la atención es su distribución alternante entre el cuello y vesículas intracelulares, que además está estrechamente controlada en conjunción con la progresión del ciclo celular. Por último, es también compleja desde el punto de vista estructural ya que posee múltiples segmentos transmembrana y varios sitios modificados postraduccionales (N-glicosilación, fosforilaciones y al menos una ubiquitinación).

Se conoce relativamente bien cuáles son y cómo actúan los factores que escoltan a Chs3 a lo largo de la ruta de secreción y endocitosis. Igualmente, se ha demostrado que la distribución de Chs3 entre vesículas intracelulares y el cuello es posible gracias al reciclaje endocítico de la proteína. Sin embargo, falta conocer el nexo entre ambos aspectos de la regulación de Chs3, ¿qué señales coordinan a la maquinaria de transporte para permitir que la QSIII se localice en el cuello en ciertas fases del ciclo y se endocite y almacene en vesículas en otras? La respuesta a esta pregunta debe residir en los propios dominios de Chs3 y en las modificaciones postraduccionales que sufre. Por tanto, el estudio de la topología de Chs3 y de sus modificaciones postraduccionales es esencial para poder profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de la QSIII.

## OBJETIVOS

1. Descifrar la topología y nuevas modificaciones postraduccionales de Chs3.
2. Analizar la función que dichas modificaciones y los distintos dominios desempeñan en la regulación de la QSIII.

## TRABAJO EXPERIMENTAL\*

### Topología de Chs3 y modificaciones postraduccionales

Mediante espectrometría de masas identificamos nuevas modificaciones postraduccionales de las descritas previamente para Chs3. El posicionamiento de estas modificaciones sobre el modelo topológico predicho en anteriores estudios nos permitió contextualizar con mayor precisión los distintos dominios de Chs3. De este nuevo modelo cabe destacar que Chs3 posee tres regiones importantes expuestas al citoplasma: el extremo N-terminal, la región central que alberga el dominio catalítico, y el extremo C-terminal.

A partir de este modelo, empezamos por analizar el papel de las distintas modificaciones postraduccionales mediante la construcción de mutantes puntuales de cada uno de los sitios encontrados. No obstante, no detectamos ningún fenotipo evidente relacionado con defectos en la síntesis de quitina o con la localización de Chs3. Ya que el extremo N-terminal concentra gran parte de los sitios sensibles de ser modificados, decidimos abordar la función de este dominio mediante la delección de fragmentos crecientes del mismo. Los mutantes construidos mostraron un comportamiento similar, siendo el más representativo de ellos la forma truncada en los primeros 126 aminoácidos de Chs3. <sup>A126</sup>Chs3 quedaba parcialmente retenida en el RE, sin embargo, era capaz de promover niveles de quitina normales. Paradójicamente, también era parcialmente resistente al antifúngico calcoflúor.

### **La delección del extremo N-terminal determina que Chs3 sea recuperada desde el Golgi al RE en vesículas COPI**

A continuación pasamos a analizar las causas de la retención observada en el RE. Empezamos abordando como causas más probable de la retención un posible defecto en el plegamiento de  $\Delta^{126}$ Chs3 o una deficiente interacción con los factores que promueven la salida de Chs3 del RE, sin embargo, ninguna de las dos suposiciones resultó ser cierta. No obstante, estos análisis nos permitieron describir a Erv14 como el adaptador que permite la incorporación de Chs3 en vesículas COPII. Finalmente, comprobamos que la acumulación de  $\Delta^{126}$ Chs3 en el RE se debía al retorno de la proteína desde el Golgi de forma dependiente de vesículas COPI y del receptor Rer1.

### **Chs3 forma dímeros a través de su dominio N-terminal**

Se había sugerido previamente que Chs3 era capaz de mediar interacciones homotípicas, por lo que una posibilidad para explicar los fenotipos observados era que el dominio N-terminal mediara esta interacción. Para comprobar esta suposición se analizó la capacidad de Chs3 para interactuar consigo misma mediante co-inmunoprecipitaciones y ensayos de "pull-down" *in vitro*. Estos ensayos se complementaron con el análisis de la migración de Chs3 y  $\Delta^{126}$ Chs3 en geles en condiciones nativas. Nuestros resultados sugieren que Chs3 es capaz de formar homodímeros en el RE, y que dicha interacción está mediada por el dominio N-terminal de la proteína. Por tanto, el sistema de control de calidad en el Golgi detecta los monómeros de Chs3 que se han escapado y los devuelve al RE para propiciar una nueva oportunidad de alcanzar su estructura cuaternaria en forma de dímeros.

### **La incapacidad de Chs3 para dimerizar afecta a la síntesis de quitina**

La fracción de  $\Delta^{126}$ Chs3 que lograba salir del RE aparecía redistribuida por toda la MP y ausente de vesículas intracelulares. Además, su acumulación en la MP era independiente de Chs4, lo que indicaba que  $\Delta^{126}$ Chs3 se endocitaba deficientemente. Este hecho explica la capacidad de  $\Delta^{126}$ Chs3 para sintetizar niveles de quitina normales pese a quedar retenida en el RE. Algunas cepas que presentan la quitina deslocalizada por sus paredes celulares, muestran cierta resistencia a calcoflúor, sin embargo no tanta como la cepa que expresa  $\Delta^{126}$ Chs3, por tanto, debe haber otra razón que explique la elevada resistencia a calcoflúor. Fibras de quitina mal ensambladas podrían mostrar una menor afinidad por calcoflúor, de acuerdo con esta premisa, proponemos que la capacidad para formar oligómeros de la QSIII, además de ser importante para el tránsito intracelular de la proteína, es una arquitectura necesaria para la correcta cristalización de las cadenas de quitina que son extruidas al espacio periplásmico.

*\*Este trabajo se encuentra en revisión en el momento de escritura de esta tesis.*

# Dimerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling

Carlos Sacristán\*, Javier Manzano-López, †Abigail Reyes\*, Anne Spang‡, Manuel Muñoz‡, and César Roncero\*§

\*Instituto de Biología Funcional y Genómica and Departamento de Microbiología y Genética. CSIC/Universidad de Salamanca. Salamanca.Spain

† Departamento de Biología Celular, Universidad de Sevilla, Sevilla. Spain

‡ Biozentrum, Growth & Development, University of Basel, Basel, Switzerland

§Corresponding author: César Roncero

## Summary

Chs3, the catalytic subunit of chitin synthase III in *Saccharomyces cerevisiae*, is a complex polytopic membrane protein whose plasma membrane expression is tightly controlled: export from the ER requires interaction with Chs7; exit from the Golgi is dependent on the exomer complex, and precise bud neck localization relies on endocytosis. Moreover, Chs3 is efficiently recycled from endosomes to the TGN in an API-dependent manner. Here we show that export of Chs3 requires the cargo receptor Erv14, in a step that is independent of Chs7. Chs3 forms dimers in the ER; failure to dimerize was not monitored by Chs7, and monomeric Chs3 was still exported by Erv14, but was sent back from the Golgi to the ER in a COPI- and Rer1-dependent manner. A subset of the dimerization-deficient Chs3 proteins evaded Golgi quality control and reached the plasma membrane. Failure to dimerize did not interfere with Chs3 activity, but did inhibit efficient endocytosis. As a result, Chs3 became mislocalized along the plasma membrane. Our data demonstrate that the dimerization of Chs3 through its N-terminus is essential for proper trafficking through the biosynthetic and endosomal pathways.

## Introduction

Chitin is the second most abundant biopolymer and is an essential component of the cell wall of most fungi. Chitin is synthesized into the periplasmic space by chitin synthases (CS). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains three different CSs with distinct biological functions: CSII is involved in the synthesis of the chitin disk that separates mother and daughter cells (Shaw et al., 1991), while CSI has only repair functions (Cabib et al., 1989). Finally, Chs3, which is the catalytic subunit of CSIII (Valdivieso et al., 1991), is responsible for the synthesis of approximately 90% of cellular chitin (Shaw et al., 1991), most of which is assembled in a chitin ring that guarantees cellular integrity at the neck during cell division (Roncero and Sanchez, 2010). Several mutants with defects in CSIII activity have been isolated and their further characterization has indicated that the corresponding Chs proteins are required for the intracellular transport of Chs3 to the plasma membrane (PM) (see (Roncero, 2002).

After synthesis and folding in the endoplasmic reticulum (ER), Chs3 depends on its export chaperone Chs7 for ER exit (Trilla et al., 1999), similar to Shr3 for the amino acid permease Gap1 and Pho86 for the phosphate transporter Pho84 (Dancourt and Barlowe, 2010). These chaperones presumably prevent aggregation of the corresponding proteins through their TM domains (Kota and Ljungdahl, 2005). However, the precise mechanism(s) of chaperone-cargo interaction and ER

exit remains unknown (Dancourt and Barlowe, 2010). After transit through the Golgi, Chs3 is sorted in a Chs5- and Chs6-dependent manner into distinct secretory vesicles, ensuring polarized transport to the PM in a cell cycle-dependent manner (Reyes et al., 2007; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006; Zanolari et al., 2011). Interestingly, the requirement for Chs5 or Chs6 can be bypassed by mutations in the endosome-TGN retrograde transport, allowing a partial rerouting of Chs3 to the PM (Valdivia et al., 2002). Chs3 interacts with Chs4, which is required for chitin synthase activation and anchoring Chs3 to the neck; failure results in the immediate endocytosis of Chs3 (Reyes et al., 2007; Sacristan et al., 2012). Upon endocytosis, Chs3 is efficiently sorted at the endosomal compartment, preventing its transport to the vacuole (Ziman et al., 1996) in an AP-1 and Ent5-dependent manner (Copic et al., 2007; Valdivia et al., 2002). These complex sorting and recycling mechanisms allow the rapid accumulation of Chs3 at the PM under stressful conditions (Valdivia and Schekman, 2003). While Chs4 and Chs7 are exclusively devoted to CSIII regulation, Chs5 and Chs6 are involved in the transport of at least one other chitin-unrelated cargo (Barfield et al., 2009). The above studies have provided the basis for the use of Chs3 as a model for studying different aspects of the intracellular transport of PM proteins.

Although many of the proteins that ensure the timely and spatial control of Chs3 trafficking have been identified, the

## Chs3 dimerization and trafficking

signals of Chs3 that are required for the complex trafficking pattern remain largely elusive. Such analysis has been hampered by the fact that Chs3 is a polytopic membrane protein for which a number of topologies have been described (<http://www.uniprot.org/uniprot/P29465>; Banks et al., 2005; Meissner et al., 2010). It appears to be clear, however, that 4 globular domains exist. Nevertheless, depending on the algorithm used a variable number of TM domains can be proposed. Any topological model advanced needs to be reconciled with the multiple post-translational modifications reported for this protein. Chs3 is glycosylated (Cos et al., 1998), phosphorylated (Albuquerque et al., 2008; Li et al., 2007) and ubiquitinated (Peng et al., 2003). However, the function of these post-translational modifications remains elusive. In contrast, Chs3 from *Candida albicans* has been shown to depend on a single phosphorylation site for proper PM localization (Lenardon et al., 2010). Finally, Chs3 is also palmitoylated at the ER, a modification required for its exit from the ER (Lam et al., 2006).

In an attempt to decipher the available clues about CSIII regulation, we began a project addressing the analysis of the biological relevance of post-translational modifications of Chs3. This analysis provided us with additional evidence supporting a topological model other than previously described ones. More importantly, we demonstrate that the oligomerization of Chs3 in the ER is a crucial process for the exit of Chs3 from the ER and for the correct endocytic turnover of Chs3 at the PM.

## Results

### Improved topological model of Chs3 through analysis of post-translational modifications

Chs3 is used as paradigm to study the temporally and spatially controlled delivery of cargo proteins to the PM (Holthuis et al., 1998; Trautwein et al., 2006; Valdivia et al., 2002), based on the characterization of the effect of different mutations on Chs3 transport. However, there are no systematic studies addressing the role that the different domains of Chs3 play in this transport, partially owing to the rather complex polytopic nature of Chs3. As a complementary approach to previous studies, we were interested in deciphering the intrinsic signals to Chs3 that govern its transport to the PM and hence we started by elucidating the membrane topology of Chs3. Bioinformatics methods consistently predict four globular domains but varying numbers of trans-membrane domains (Banks et al., 2005; Merzendorfer, 2011) (Fig. 1A). Massive mass spectrometric analyses (<http://www.uniprot.org/uniprot/P29465>) have indicated that domains I and III of Chs3 are phosphorylated. This led to the only topological model proposed so far of domains I, II and III of Chs3 facing the cytosol and domain IV facing the periplasmic space (Meissner et al., 2010). However, the C-terminal domain of Chs3 has been shown to be cytoplasmic (Kim et al., 2006), which is in agreement with the correct processing of this region in a split-ubiquitin system (C. Sacristan, unpublished observations). In

addition, the proposed topology failed to take into account the known N-glycosylation of Chs3 (Cos et al., 1998). Therefore, the previously proposed model is likely to be incorrect, in particular with respect to the positioning of domain II. We were unable to detect any cytoplasmic post-translational modifications for region II (results not shown), suggesting that this domain could be exposed to the extracellular space, thus being prone to N-glycosylation. This domain contains three potential N-glycosylation sites at positions 303, 332 and 371. Upon mutating all three asparagines to glutamines, the N-glycosylation of Chs3 was completely abolished (Fig. S1A). This result is in agreement with the recent identification of N-glycosylation at position 332 of Chs3 in a massive analysis (Breidenbach et al., 2012). Therefore, region II must reach the ER lumen and hence face the extracellular space at the PM. Based on our data, we revised the topology model for Chs3 and propose that while regions I, III and IV are cytoplasmic, region II would face the extracellular space (Figure 1A), being glycosylated at the indicated positions.

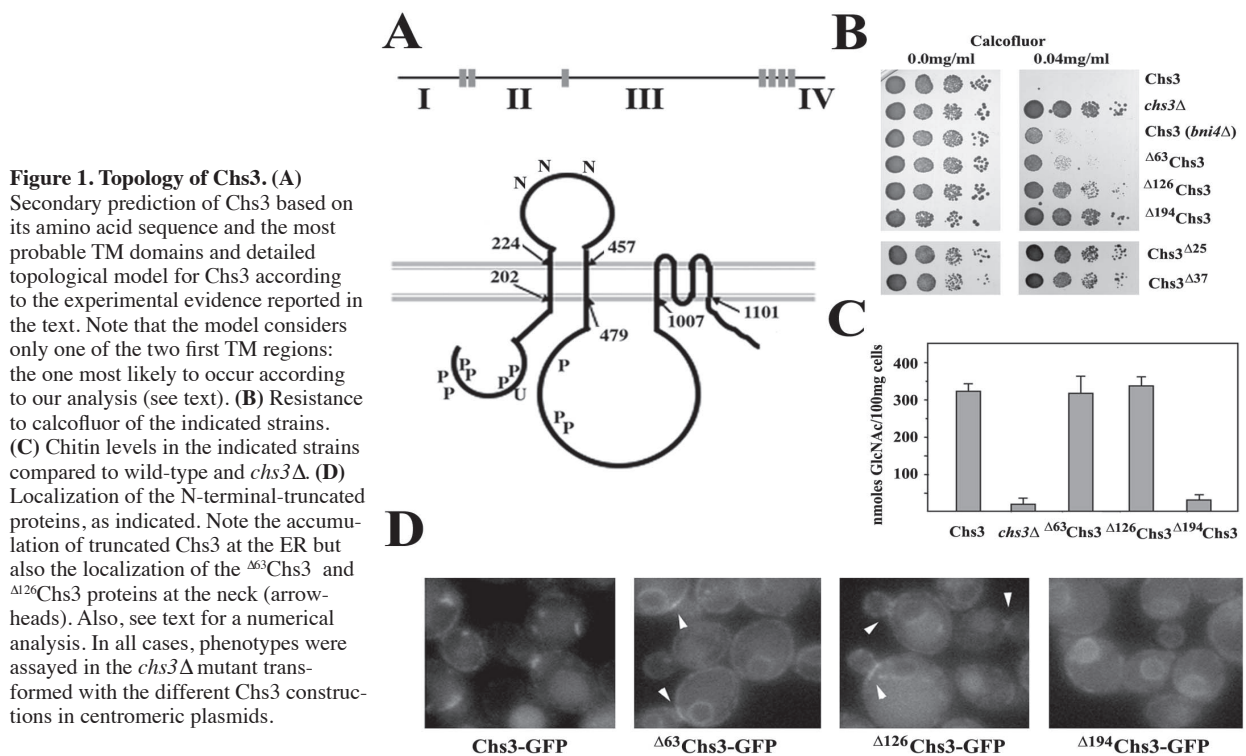
### The N-terminal domain of Chs3 is required for Chs3 activity and localization.

Based on this model, we determined the role of N-glycosylation for Chs3 function. Similar to the wild-type, the single, double or triple Asn (N) to Gln (Q) mutants were sensitive to calcofluor (Figure S1B) and showed normal calcofluor staining (Figure S1C). In addition, the mutated Chs3 proteins localized in a manner that was indistinguishable from that seen for wild-type Chs3, accumulating at the neck and at punctate intracellular structures (Figure S1C). These results suggest that N-glycosylation is not essential for Chs3 localization and function.

Interestingly, deletions of the N-terminal (domain I) or C-terminal regions (domain IV) (see supplementary Figure S2 for details) compromised Chs3 functionality based on the increased resistance to calcofluor of the corresponding strains (Figure 1B). The proteins lacking the last 25 or 37 amino acids (Chs3<sup>Δ25</sup> or Chs3<sup>Δ37</sup>, see Figure S2) elicited full resistance to calcofluor (Figure 1B) and the absence of calcofluor staining (not shown), in agreement with a previous report (Cos et al., 1998).

Much more puzzling were the results obtained by truncating the Chs3 protein at the N-terminal domain I. All truncations (see Figure S2 for details on truncations) conferred resistance to calcofluor, although to different degrees and proportional to the size of the deletion. The <sup>Δ194</sup>Chs3 protein promoted full resistance to calcofluor (Figure 1B) that was associated with very low chitin levels, similar to those of the original *chs3Δ* mutant (Figure 1C). However, the <sup>Δ63</sup>Chs3- and <sup>Δ126</sup>Chs3-containing strains were partially resistant to calcofluor (Figure 1B) but showed normal calcofluor staining (not shown) and normal levels of chitin (Figure 1C). When we addressed the localization of these N-terminal-truncated proteins by GFP tagging, we found that all of them accumulated at the ER (Figure 1D). The wild-type Chs3 localized to the bud neck

## Chs3 dimerization and trafficking



in small and large budded cells ( $32.6\% \pm 4.7$ ;  $n=265$  cells). In cells expressing the smallest truncation, an accumulation of  $\Delta^{63}$ Chs3-GFP at the ER was noticeable, but some  $\Delta^{63}$ Chs3 still reached the bud neck (bud neck staining:  $16.9\% \pm 2.9$ ;  $n=177$  cells). Similar results were observed with  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP (bud neck staining:  $17.5\% \pm 3.6$ ;  $n=182$  cells), while  $\Delta^{194}$ Chs3-GFP was almost exclusively retained in the ER (bud neck staining:  $0.0\% \pm 0.0$ ;  $n=100$ ) (see supplementary Figure S3A for a quantitative analysis of the localization). These results are consistent with a dual function of the N-terminal region I: namely, chitin synthase activity and Chs3 localization.

While the absence of functionality of the  $\Delta^{194}$ Chs3 protein could be explained easily in terms of the collapse of its intracellular transport (see Discussion), the results obtained with the smaller truncation raised two immediate questions: a) Why do these proteins accumulate at the ER? b) Why are these proteins apparently fully functional in chitin synthesis (Figure 1C) despite their significant retention at the ER? We shall concentrate on the characterization of the  $\Delta^{126}$ Chs3 protein to address these questions.

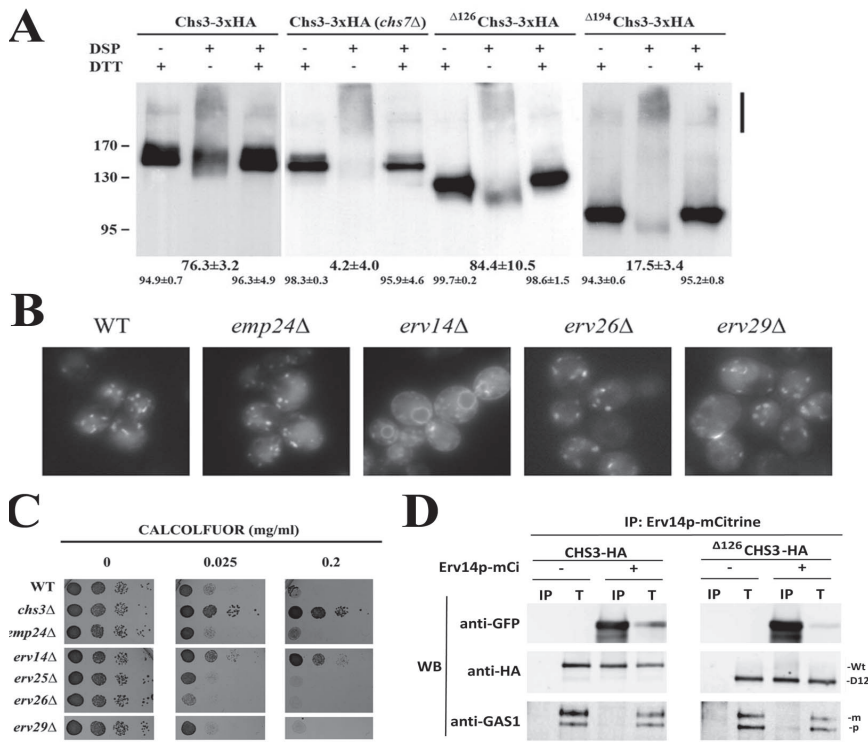
#### The N-terminal truncated proteins exit the ER but are returned back from the Golgi.

The accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 at the ER could be due to its inefficient exit from the ER. Previous reports have indicated that a critical step in Chs3 exit from the ER is the prevention of the formation of protein aggregates (Kota and Ljungdahl,

2005). In the absence of palmitoylation (*pfa4Δ* mutant) or the Chs7 chaperone (Lam et al., 2006) (Kota and Ljungdahl, 2005), Chs3 aggregates through its TM domains, preventing its loading into COPII vesicles and hence its exit from the ER. Thus, we wondered whether  $\Delta^{126}$ Chs3 aggregates in the ER.

After DSP treatment  $\Delta^{126}$ Chs3 still appeared mostly in a monomeric form, similarly to the wild-type protein (Figure 2A). In contrast,  $\Delta^{194}$ Chs3 ran mostly as high-weight aggregates, similarly to the wild-type protein in the absence of Chs7 (Figure 2A). Thus, at least in the case of  $\Delta^{126}$ Chs3 the formation of aggregates was not the cause of ER retention. Moreover, our data indicate that Chs7 and palmitoylation are not critical factors for ER retention of the N-terminal truncations.

An alternative explanation would be that truncated Chs3 proteins fail to be recognized by the COPII export machinery that drives the selective capture and concentration of the secretory cargo into ER-derived vesicles (Dancourt and Barlowe, 2010). To address this possibility, we first attempted to identify the mechanism by which Chs3 is exported from the ER. Given that many transmembrane secretory proteins that reside at the PM require the cargo receptor Erv14 to leave the ER (Herzig et al., 2012), we tested whether this cargo receptor also facilitated the ER export of Chs3. As shown in Figure 2B, Chs3 was retained at the ER in the *erv14Δ* mutant but not in mutants lacking other types of ER cargo receptors. In addition, Erv14 specifically co-immunoprecipitated Chs3, but not other unrelated secretory proteins such as the GPI-anchored



**Figure 2. Intracellular behaviour of the N-terminal-truncated Chs proteins.** (A) Aggregation of different Chs3 after DSP crosslinking. The sharp bands in the central lanes reflect the amounts of the non-aggregated protein (see Materials and Methods for details). Compare the intensity of the bands in the central lanes with those in the side lanes, acting as controls. The numerical values are the averages of three independent experiments and show the relative amounts of the lower monomeric bands compared with those of the aggregated bands (upper part of the gels; see region marked on right). Aggregation was also monitored for the wild-type Chs3 in the *chs7Δ* mutant. (B) Localization of the indicated Chs3 expressed from pRS315 in the indicated mutants affected in ER exit receptors. Note the accumulation of Chs3 in the ER of the *erv14Δ* strain (C) Calcofluor resistance in the same mutants. (D) Co-immunoprecipitation of Chs3 and Erv14. Yeast cells contain the tagged Erv14-mCi and the indicated versions of Chs3-3xHA in centromeric plasmids. IP was performed with anti-GFP antibody and the IP product was separated in gels that were developed with anti-GFP, anti-HA or anti-GAS1 antibodies, as indicated. Note the presence of Chs3-3xHA and  $\Delta^{126}$ Chs3-3xHA, but not of Gas1, in the samples after Erv14 IP.

protein Gas1, a well known cargo of the p24 receptor (Muñiz et al., 2000). Taken together, these results indicate that Erv14 functions as the ER exit receptor for Chs3. Consistent with such a role, the *erv14Δ* mutant is resistant to calcofluor while the rest of the cargo receptor mutants are not (Figure 2C). Once we had identified Erv14 as the cargo receptor for Chs3, we next tested whether Erv14 fails to recognize the  $\Delta^{126}$ Chs3 protein. Interestingly, both proteins were efficiently co-immunoprecipitated (Figure 2D), indicating that  $\Delta^{126}$ Chs3 can still exit the ER by interacting with its cargo receptor.

**$\Delta^{126}$ Chs3-GFP is retrieved from the Golgi to the ER in a COPI- and Rer1-dependent manner**

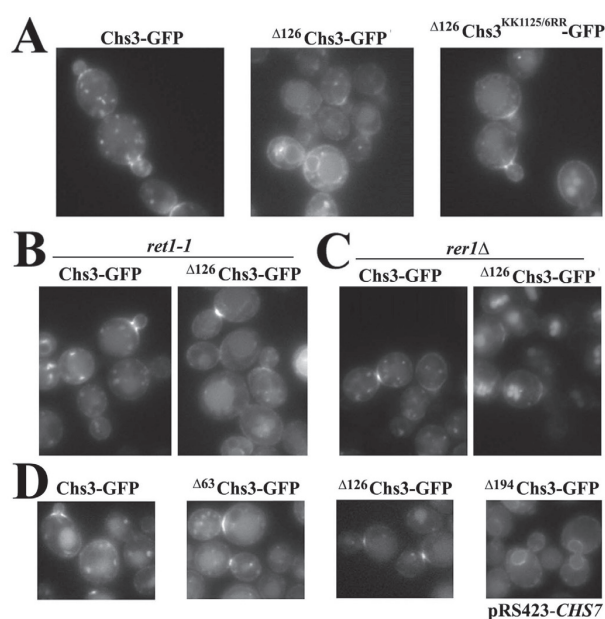
Since  $\Delta^{126}$ Chs3 seems to exit the ER normally, its accumulation at this organelle could be explained in terms of its recycling from the Golgi compartment if  $\Delta^{126}$ Chs3 were recognized there as a misfolded protein and then be returned back to the ER in COPI retrograde transport vesicles. To test this hypothesis, we blocked retrograde transport from the Golgi to the ER by using a temperature-sensitive mutant in the  $\alpha$ -COP subunit of the coatamer of COPI vesicles, *ret1-1*. Under these conditions,  $\Delta^{126}$ Chs3 was no longer efficiently retained in the ER but mainly localized to the PM and the vacuole (Fig. 3B, see also Suppl. Figure S3B for a quantitative analysis, and S4 for additional images). In addition, a mutated version of Chs3 (Chs3<sup>KK1125/6RR</sup>-GFP) lacking a C-terminal di-lysine motif putatively involved in COPI loading was not retained in the ER and reached the

PM efficiently (Figure 3A and Figure S3B). Taken together, our data strongly suggest that  $\Delta^{126}$ Chs3 is a substrate for a Golgi quality control system and that it is sent back in COPI vesicles to the ER for refolding.

Rer1 has been demonstrated to mediate the retrieval of type I and polytopic membrane proteins to the ER in both yeast and mammalian cells (review in (Dancourt and Barlowe, 2010). Until recently, it was assumed to work in the retrieval of ER-resident transmembrane proteins. However, the surface expression of the acetylcholine receptor in muscle cells is dependent on Rer1, which retrieves unassembled alpha subunits and sends them back to the ER and prevents their degradation in lysosomes (Valkova et al., 2011). Thus, non-ER-resident proteins can also be Rer1 substrates. We tested whether the retrieval of  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP was also dependent on Rer1. While the deletion of *RER1* essentially had no effect on Chs3-GFP localization,  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP was no longer efficiently retained in the ER and accumulated partially in the vacuole (Figure 3C; see also Suppl Figure S3B). In agreement with this result, Rer1 immunoprecipitated together with  $\Delta^{126}$ Chs3 more efficiently than with the wild-type Chs3 protein (Fig S3D). Thus, Rer1 may recognize the incorrectly folded  $\Delta^{126}$ Chs3 protein and promote its inclusion in COPI vesicles destined for the ER.

Our results clearly suggest that the retrograde transport from the Golgi is the direct cause of the accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 proteins at the ER. However, we have previously shown that Chs7 is synthesized in limited amounts (Trilla et al., 1999),

**Chs3 dimerization and trafficking**



**Figure 3. Microscopic analysis of the ER-to-Golgi transit of Chs3.** (A) Intracellular localization of different versions of Chs3 in the wild-type strain. Note the significant accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP at the ER, alleviated after the replacement of the di-lysine motif at position 1125-1126 (right). (B) Localization of the indicated Chs3 proteins in the *ret1-1* mutant. Cells were grown at 24°C to avoid defects in the anterograde transport from the ER shown by the *ret1-1* mutant. Compare with the images shown in panel A. Note the release of the  $\Delta^{126}$ Chs3 protein from the ER and its massive accumulation in vacuoles. (C) Localization of the indicated Chs proteins in the *rer1* $\Delta$  mutant. Compare with images shown in panel A and note the release of the  $\Delta^{126}$ Chs3 protein from the ER and its massive accumulation in the vacuoles. (D) Localization of the indicated Chs3 expressed from pRS315 in strains also transformed with the multicopy pRS424::*CHS7* plasmid. Compare with the images shown in Figure 1D. See also Figure S3 for a quantitative analysis of the data.

which could lead to a functional shortage of Chs7 in the strain containing  $\Delta^{126}$ Chs3. If this were true, overexpression of *CHS7* should also alleviate the accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 at the ER. Indeed, after *CHS7* overexpression most  $\Delta^{126}$ Chs3 and  $\Delta^{63}$ Chs3 proteins were released from the ER (Figure 3D, see also Fig S3B). In contrast the overexpression of *CHS7* did not have any apparent effect on  $\Delta^{194}$ Chs3 traffic. (Figure 3D)

### Chs3 oligomerizes through its N-terminal domain

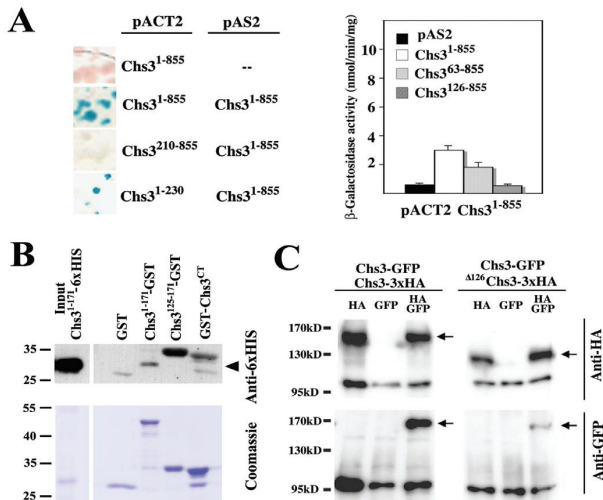
Although, we have convincingly shown above that  $\Delta^{126}$ Chs3 is efficiently retrieved from the Golgi, we were puzzled by the reason for such retrieval. The most obvious reason, namely incorrect folding, cannot have been involved because the truncated proteins were functional. One evident possibility would be that by deleting the N-terminal region, we would be interfering with the insertion, and probably the topology, of Chs3 in the ER. To test this possibility, we checked the glycosylation state of the N-terminal truncations as described above. However, we were unable to detect any difference in the glycosylation pattern between the wild-type and mutant

proteins (data not shown), indicating that truncated proteins are efficiently recognized by the N-glycosylation machinery and hence that they are correctly inserted into the ER membrane.

It has been proposed that Chs3 may form oligomers and that the N-terminal half of the protein might be involved in this oligomerization (DeMarini et al., 1997). To follow up these initial findings, we performed an in-depth yeast two-hybrid analysis. We used a C-terminal-truncated version of Chs3 that contained only the first 855 amino acids (Chs3<sup>1-855</sup>), since inclusion of the C-terminal region, which contains multiple transmembrane domains, abolished two-hybrid interactions (not shown). This truncated protein was able to interact with itself (Figure 4A) and with Chs4 (not shown), as previously reported (DeMarini et al., 1997; Meissner et al., 2010). Deletion of the first 210 amino acids of Chs3 abolished the interaction with Chs3 but not with Chs4 (not shown). These results indicate that the N-terminal domain I was required for the self-association of Chs3. Accordingly, the expression of only the first 230 amino acids of Chs3 (Chs3<sup>1-230</sup>) was sufficient for interaction with Chs3<sup>1-855</sup> (Figure 4A), but not with Chs4 (not shown), whose interaction site has been assigned roughly to the middle part of Chs3 (Meissner et al., 2010). To corroborate our findings, we resorted to the more quantitative  $\beta$ -galactosidase assay (Fig. 4A, right panel). The creation of N-terminal deletions demonstrated that the first 63 aa of Chs3 played only a minor role in self-recognition because of the modest reduction in  $\beta$ -galactosidase activity (Figure 4A, right panel). However, when interaction with Chs3<sup>1-855</sup> was assayed the protein lacking the first 126 aa (Chs3<sup>126-855</sup>) afforded  $\beta$ -galactosidase levels similar to those of the negative control. From these results, we conclude that the minimal self-association domain of Chs3 resides between residues 63 and 126. However, these results did not demonstrate directly that the interaction occurred through the N-terminal region of Chs3. To confirm this, we expressed the first 171 amino acids of Chs3 tagged with 6xHIS or GST tags in *E.coli*. *In vitro* the Chs3<sup>1-171</sup>-GST protein fragment was able to recruit the Chs3<sup>1-171</sup>-6xHIS fragment (Figure 4B), but this recruitment did not occur when the truncated Chs3<sup>125-171</sup>-GST was used as the bait, similarly to what we observed in case of the C-terminal region of Chs3 (Chs3CT).

To show that this self-association of Chs3 also occurred *in vivo*, we expressed two versions of Chs3 in the same cell: one GFP-tagged and the other 3xHA-tagged. In event of self-association, it would be possible to co-immunoprecipitate GFP-tagged Chs3 with anti-HA antibodies. GFP-tagged Chs3 co-precipitated with Chs3-3xHA, confirming that Chs3 could at least form dimers, and –potentially– also higher-order structures (Fig. 4C). When we deleted the first 126 aa of Chs3 ( $\Delta^{126}$ Chs3-3xHA), only trace amounts of Chs3-GFP were co-isolated, demonstrating that the N-terminal 126 aa of Chs3 contain the self-association domain. Taken together, our results are consistent with Chs3 oligomerization through its N-terminal region, placing the minimal self-association domain of Chs3 between residues 63 and 126.

## Chs3 dimerization and trafficking



**Figure 4. Evidence for Chs3 self-interaction.** (A) Two-hybrid analysis of the interaction of Chs3 with itself. Different truncations of Chs3 were used, as indicated in the figure. Chs3<sup>1-855</sup> was used as the full Chs3 protein (see text for details). Blue colour indicates a positive interaction. Analysis of two-hybrid interactions between different fragments of Chs3 as indicated by quantitative determination of  $\beta$ -galactosidase levels. The results are the averages of three independent experiments and the SDs are indicated. Note the significant reduction in  $\beta$ -galactosidase levels observed when using the Chs3<sup>126-855</sup> truncated protein. (B) Pull-down assays of the N-terminal fragments of Chs3. Purified Chs3<sup>1-171</sup>-6xHIS was mixed with the indicated GST fragments bound to GSH-agarose beads. After extensive washing, the bound proteins were eluted in sample buffer and separated in two gels, one stained with Coomassie and the other developed with the anti-6xHIS antibody. Note the appearance of the 6xHIS-tagged fragment only in the Chs3<sup>1-171</sup> lane (arrow head). (C) Co-immunoprecipitation of Chs3 tagged with different epitopes. Yeast cells contained the two versions of Chs3 in centromeric plasmids, as indicated in the figure, and pRS424::CHS7 to prevent any spurious retention of Chs3 in the ER. IP was performed with anti-HA antibody and the IP products were separated in two gels that were developed with anti-HA or anti-GFP antibodies, as indicated. Note the low intensity of the Chs3-GFP band when IP was performed on the  $\Delta^{126}$ Chs3-3xHA-containing strain.

### Chs3 forms dimers in the ER independently of Chs7

Even though we observed that Chs3 self-assembled, the number of Chs3 molecules forming a complex remained unclear. To gain insight into the stoichiometry of the Chs3 complex, we performed blue native-PAGE electrophoresis (BN-PAGE) in the presence of 1% digitonin, which allowed clear separation of a Chs3 band of approximately twice the size of the monomeric Chs3 (Fig. 5A, compare native and SDS-treated samples). This result suggests that wild-type Chs3 runs mostly as a dimer. In contrast,  $\Delta^{126}$ Chs3 migrated mostly as a band corresponding to a monomer, and the potential position of the dimer only showed a faint smear (Figure 5A), consistent with a strongly reduced dimer formation and with the co-immunoprecipitation results reported above (Fig. 4C). Interestingly, the insertion of a 3xHA tag at the beginning of Chs3 produced a functional protein but also promoted reduced levels of dimerization associated with calcofluor resistance (see supplementary Figure S5). An important control for these experiments was provided by the behaviour of Chs3 in the *chs7* $\Delta$  mutant. Lack of Chs7 causes ER retention of Chs3, and as a result Chs3 aggregates (Kota and Ljungdahl, 2005). We detected these aggregates as a strong smear in the BN-PAGE. More important, however, was the detection of monomeric and dimeric forms of Chs3 under these conditions. This not only provided the detection of the monomer and the dimer as a size control, but also suggested that the dimerization of Chs3 occurred in the absence of Chs7. In order to confirm this result, we performed co-immunoprecipitation experiments in the *chs7* $\Delta$  mutant (Figure 5B). The absence of Chs7 did not modify the co-IP results and it may therefore be concluded that the dimerization of Chs3 is independent of its interaction with Chs7 and might even be a pre-requisite for ER exit (see Discussion).

### Chs3 dimerization is required for proper endocytic turnover

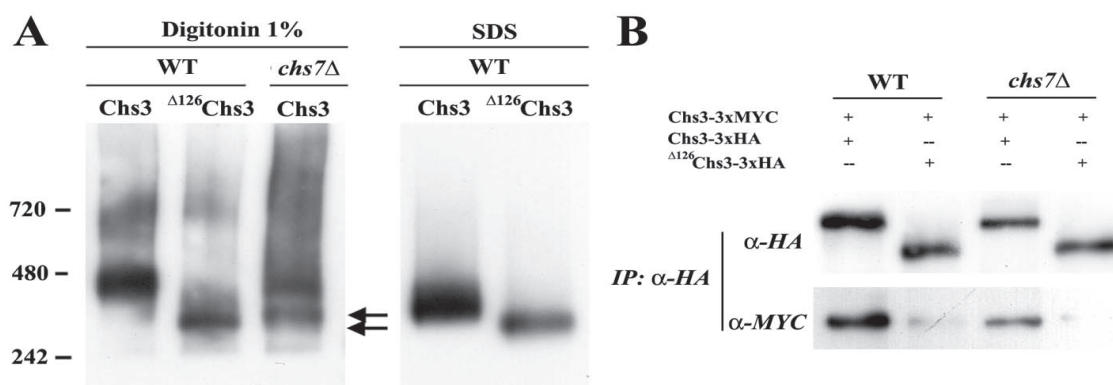
The results reported so far explain why less  $\Delta^{126}$ Chs3 reaches the PM, but they do not explain why we observed similar chitin levels in  $\Delta^{126}$ Chs3 and full-length Chs3 or the increased resistance to calcofluor (Figure 1B and 1C). These phenotypes are probably related to the properties of the Chs3 pool reaching the PM. Wild-type Chs3 is confined to the bud neck region at the PM. In contrast,  $\Delta^{126}$ Chs3 spilled from the bud neck region and was also found throughout the PM (Fig. 6A). This phenotype was reminiscent of the one observed after treatment of wild-type cells with the actin polymerization inhibitor latrunculin A (latA) and in endocytosis mutants (Fig. 6A and (Reyes et al., 2007; Zanolari et al., 2011)), indicating that the internalization of  $\Delta^{126}$ Chs3 might occur less efficiently than that of wild-type Chs3. This delay in internalization was confirmed by subcellular gradient fractionation because more  $\Delta^{126}$ Chs3 co-migrated with the plasma membrane ATPase Pma1 than full-length Chs3 (Fig. 6B, compare lanes 1-3 in both gradients).

Chs4 is required for anchoring Chs3 to the bud neck and failure of this to occur leads to prompt endocytosis of Chs3 (Reyes et al., 2007; Sacristan et al., 2012; Fig. 6C). In contrast,  $\Delta^{126}$ Chs3 remained localized to the PM in the absence of Chs4 and was absent from intracellular structures, supporting the notion that this mutant protein is endocytosed inefficiently. However,  $\Delta^{126}$ Chs3 did not escape regulated trafficking because it was efficiently retained in the Golgi apparatus in the absence of Chs5, a member of the Chs3-sorting complex, exomer (not shown).

However, it remained to be tested whether the longer retention time of  $\Delta^{126}$ Chs3 at the PM could produce higher CSIII activity, as suggested by the *in vivo* phenotypes (Figure 1B and 1C). First, we measured the total CSIII activity (Fig. 6D; with trypsin) and found no difference between the wild-type and

## Chs3 dimerization and trafficking





**Figure 5. Oligomerization status of Chs3.** (A) Protein extracts were obtained from the indicated strains containing the two versions of Chs3 in plasmid pRS315. The wild-type strains also contained the pRS424:*CHS7* plasmid to prevent the accumulation of Chs3 in the ER. Protein extracts were obtained under non-denaturing conditions, solubilized with 1% digitonin at 4°C, and then run in BN-PAGE gels under strict non-denaturing conditions (left panel) or after SDS treatment (right panel). Both panels are images from a single western blot, but the right panel is significantly underexposed as compared to the left one. SDS-treated samples would correspond to the monomeric forms of the proteins and their position is marked by arrows. Note the appearance of the full Chs3 with a molecular size compatible with a dimeric form of the protein. The  $\Delta^{126}$ Chs3 protein shows a very similar gel mobility that that of the monomeric SDS-treated form. Note the partial dimerization of wild-type Chs3 in the *chs7Δ* mutant and the smear along the lane caused by the aggregation of Chs3 in the absence of Chs7 (Kota and Ljungdahl, 2005). This lane also serves as a control for both the monomeric and dimeric aggregation status of the protein. (B) Co-immunoprecipitation of Chs3 tagged with different epitopes in wild-type and *chs7Δ* cells. The yeast cells contain the two versions of Chs3 in centromeric plasmids, as indicated in the figure. IP was performed with anti-HA antibody and the IP product was separated into two gels that were developed with anti-HA or anti-MYC antibodies.

$\Delta^{126}$ Chs3, indicating that the N-terminal-truncated protein is not more active than the full-length Chs3. Next, we examined the basal level of CSIII activity (Fig. 6D, w/o Trypsin), which reflects the amounts of CSIII confined to the PM (Reyes et al., 2007). Interestingly, under these conditions the activity of  $\Delta^{126}$ Chs3 was much higher, comparable to the CSIII activity seen in the endocytosis mutant *end4Δ*. Therefore, our data indicate that the defect in  $\Delta^{126}$ Chs3 endocytosis would be responsible for the similar chitin levels of cells expressing full-length or truncated Chs3. In agreement with this interpretation, chitin was relatively evenly distributed throughout the yeast cell wall, with a slight concentration in the bud neck region in  $\Delta^{126}$ Chs3 cells (Fig. 6E). However, the overall signal intensity of the calcofluor staining was not higher in  $\Delta^{126}$ Chs3-expressing cells in comparison with the wild-type.

It is conceivable that deletion of the first 126 aminoacids might affect the ubiquitination of Chs3, which has been shown to occur at least at K136 (Peng et al., 2003). To test this possibility, we introduced a K136R mutation, which should prevent ubiquitination at this site. Three additional lysines in close proximity (K118, 119, 123) were equally mutated to arginines, and the localization of the quadruple mutant was assessed (Fig. 6A, left most panel). Surprisingly, the Chs3<sup>RRRR</sup>-GFP construct was mostly localized correctly; the staining was confined to the bud neck region and to internal structures, similarly to what was observed for the wild-type. In addition, we tested the biological consequence of mutating the four lysines to arginines. In agreement with our localization data, cells containing the Chs3<sup>RRRR</sup> were sensitive to calcofluor, and even slightly hypersensitive when sensitivity was assessed at

low calcofluor concentrations (Fig. 6F). This hypersensitivity correlated with the appearance of chitin patches after calcofluor staining (Figure 6D, let most panel), likely associated with a higher retention time of Chs3<sup>RRRR</sup> at the PM. Neither of these phenotypes was observed in the cells containing  $\Delta^{126}$ Chs3. In addition mutating the known phosphosites 29, 37, 125, 147 and 148 produced functional proteins with normal intracellular localization (not shown). Thus, the alterations in the ubiquitination or phosphorylation at the N-terminal domain are not the main reason for the reduction in endocytosis of  $\Delta^{126}$ Chs3. We conclude that dimerization most likely affects the endocytic turnover of Chs3 directly.

## Discussion

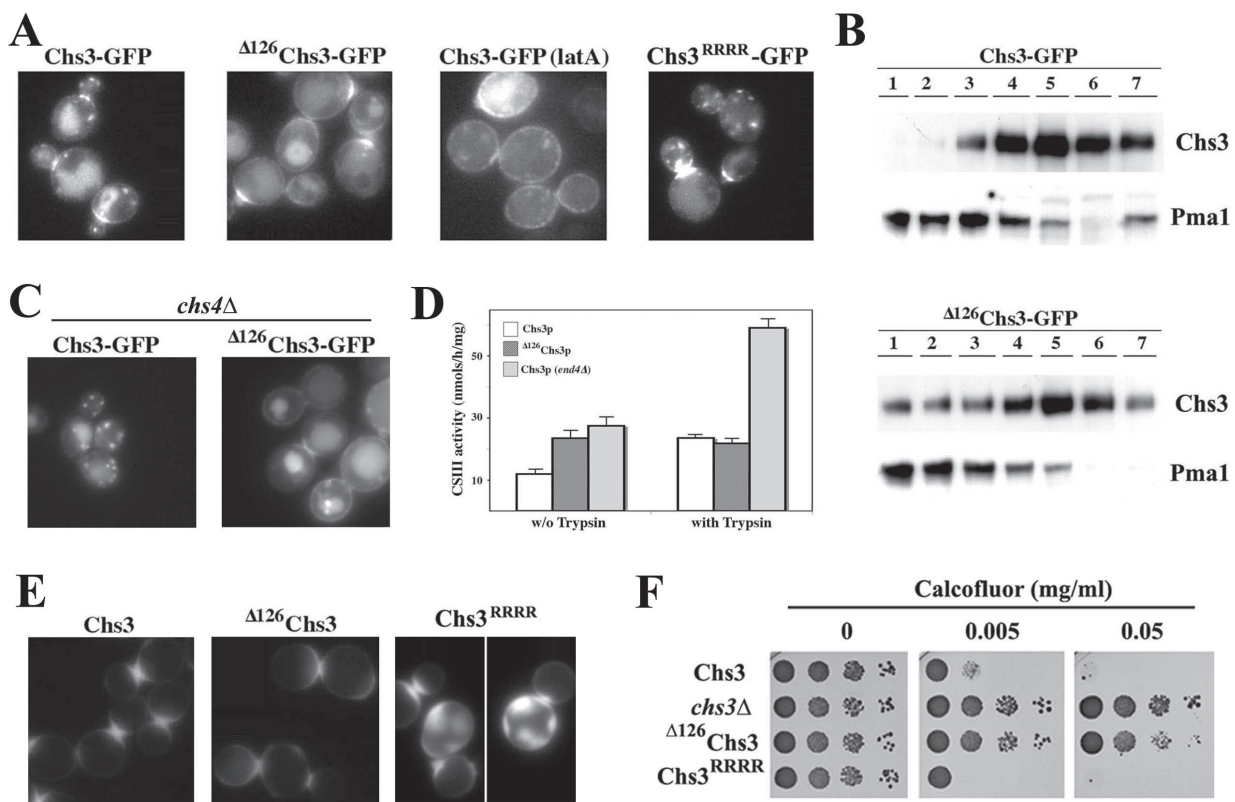
Despite the progress made in recent years regarding the proteins involved in the intricate trafficking behaviour of the chitin synthase Chs3, very little is known about the regions of Chs3 required for proper transport and localization. Here we revisited this issue using an improved topology model for the multi-transmembrane-spanning Chs3. We identified the cytoplasmic N-terminal region I of Chs3 as being important for correct intracellular localization. This region contains a dimerization motif, which is required for both efficient export from the ER and for endocytosis at the PM. Delayed endocytosis results in higher CSIII activity at the PM, and the spreading of the enzyme and the synthesized chitin along the whole cell surface. Interestingly, the chitin synthesis activity of a dimerization-deficient mutant did not seem to be compromised under these conditions. Thus, the dimerization of Chs3 may not be a pre-requisite for Chs3 activation and

function at the PM.

Our data suggest, however, that the way chitin is deposited and anchored would be affected by the inability of Chs3 N-terminal truncations to dimerize. Despite the relatively similar chitin synthesis levels of the dimeric and monomeric forms of Chs3 (the N-terminal truncations), the expression of the monomeric forms led to calcofluor resistance, as though the calcofluor were unable to intercalate with the chitin properly (Roncero and Duran, 1985) and thus poison the cell. A role for dimerization in chitin synthesis levels could perhaps be expected, since the proper synthesis of cellulose—another  $\beta(1-4)$  polymer with a crystalline structure—depends on cellulose synthase oligomerization at the PM of plant cells (Atanassov

et al., 2009). It would be tempting to speculate that synthase oligomerization might be a general prerequisite for the proper synthesis of cell wall polymers with a crystalline structure.

The N-terminal truncations of Chs3 that were unable to dimerize efficiently were enriched in the ER at steady-state. However, at least the two shorter truncations did leave the ER efficiently, and were sent back to the ER from the Golgi in a Rer1- and COPI-dependent manner. This result is compatible with the role of Chs7 in Chs3 exit from the ER. Like Gsf2, Pho86 and Shr3, Chs7 is a member of the family of ER-specific chaperones that facilitate proper protein folding at the ER. It has been shown that Shr3 binds to the N-terminal 5 transmembrane segments of Gap1, also to allow proper



**Figure 6. Biochemical and functional analysis of the arrival of Chs3 at the PM.** (A) Localization of the indicated versions of Chs3-GFP in plasmid pRS315. The strains also contained the pRS424::*CHS7* plasmid to avoid spurious retention of Chs3 at the ER.  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP is distributed along the PM and it is mostly absent from intracellular structures, similarly to what occurs for Chs3 after *latA* treatment. The Chs3<sup>RRRR</sup>-GFP protein that lacked lysines at positions 118,119,123 and 136 localizes to the bud neck region and to intracellular structures in a similar way to wild-type Chs3. (B) Subcellular fractionations (see Materials and Methods for details) of Chs3 and  $\Delta^{126}$ Chs3 proteins on discontinuous sucrose gradients. Note the accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 in the PM fractions, which contain most of the Pma1 marker (lanes 1 to 3). (C)  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP, but not Chs3-GFP, accumulates at the PM in the *chs4Δ* mutant. (D) CSIII activity in the indicated strains. Activity was measured without (basal) or after trypsin activation (total). As a control, CSIII activity was also determined in the W303 *end4Δ* mutant (Reyes et al., 2007). The results are the averages of three independent experiments, showing SD values. Note the higher basal levels promoted by  $\Delta^{126}$ Chs3, similar to those obtained in the *end4Δ* mutant. In this mutant total activity is heavily increased due to contamination with other CS activities. (E) Calcofluor staining of the indicated strains. Note the patchy staining of the Chs3<sup>RRRR</sup> strain, which is very similar to that observed for a Chs3 wild-type strain in the absence of endocytosis (Reyes et al., 2007). (F) Calcofluor resistance of the strains containing the indicated Chs3 proteins in plasmid pRS315. Note the slight hypersensitivity to calcofluor of the Chs3<sup>RRRR</sup>-containing strain compared with the calcofluor resistance of the  $\Delta^{126}$ Chs3 strain.

### Chs3 dimerization and trafficking

folding of the remaining 7 TMDs (Kota et al., 2007). In analogy to Shr3, Chs7 would be able to interact normally with the TMDs of  $\Delta^{126}$ Chs3, allowing its interaction with the Erv14 receptor and its exit from the ER, similar to wild-type Chs3. The physical interaction of Chs3 with Erv14 still occurred in the absence of Chs7 (data not shown), suggesting that the aggregation of Chs3 at the ER physically prevents its loading into COPII vesicles in the *chs7* $\Delta$  mutant, hence providing new clues concerning the role of ER chaperones such as Chs7. In agreement with this, the  $\Delta^{194}$ Chs3 mutant protein was retained in the ER in all conditions tested, probably because of its high level of aggregation at the ER. Interestingly, Chs3 was able to dimerize in the absence of Chs7 (Figure 5A,B), albeit less efficiently, reinforcing the general idea that dimerization and Chs7 contribute independently to the exit of Chs3 from the ER. The identification of Erv14 as the ER exit receptor of Chs3 is consistent with recent reports suggesting that Erv14 would be the major facilitator for the ER export of membrane-spanning proteins of the late secretory pathway or PM (Castillon et al., 2009; Herzig et al., 2012), including those dependent on ER chaperones, whose mechanism of exit remains poorly understood (Dancourt and Barlowe, 2010). Moreover, our results would be compatible with Erv14 interacting with the TM regions of the cargo (Herzig et al., 2012), since these regions are probably unaffected in the truncated protein.

More surprising was the finding of  $\Delta^{126}$ Chs3 leaving the ER and being retrieved from the Golgi vesicles, since this indicates that the truncation must be recognized by a post-ER quality control pathway. The retrieval was dependent on the Golgi-ER-sorting receptor Rer1, in agreement with the notion of Rer1 interacting more efficiently with the N-terminal-truncated Chs3 versions. It has been proposed that Rer1 recognizes transmembrane domains in different modes (review in (Dancourt and Barlowe, 2010)). However, in the case of Chs3, our data suggest a correct assembly of the TMDs in the  $\Delta^{126}$ Chs3 protein. Therefore, we favour a model in which the presence of a potential recognition signal in Chs3 would be shielded in the dimer. In addition, dimerization also seems to conceal a C-terminal di-lysine motif required for COPI interaction, suggesting that the signals required for retrograde transport would only be exposed in the dimerization-compromised  $\Delta^{126}$ Chs3, promoting the sorting of this protein into COPI vesicles destined to the ER. Interestingly, the elimination of the di-lysine motif seems to be the most effective way of preventing  $\Delta^{126}$ Chs3 accumulation, suggesting that it would act as the critical determinant for the retrieval of Chs3 in COPI vesicles. A similar mechanism also acts on the transport of the human immunoglobulin Fc $\epsilon$ RI receptor (Letourneur et al., 1995), but this has not been reported previously for yeast polytopic proteins that depend on specific ER chaperones.

Taken together, our data support a model in which the dimerization of Chs3 is necessary at different steps for its proper transport to the PM. Beyond affecting the endocytic recycling of Chs3, defects in dimer formation make Chs3 a substrate of a Golgi-associated quality control (GAQC) system

based on the retrograde transport chaperone Rer1 and COPI vesicle transport. Whether other cargos that are dependent on transport chaperones for ER exit are also subject to GAQC remains to be elucidated. Nevertheless, it is surprising that at least the ER chaperone Chs7 cannot distinguish between the monomer and dimer forms of Chs3, thus probably being unable to proofread the assembly of Chs3 at the ER.

In conclusion, although not essential for chitin synthase activity the dimerization of Chs3 is carefully monitored intracellularly. This surveillance is based on the recognition of protein domains hindered or exposed by the dimerization, allowing rerouting of the incorrectly dimerized proteins along their intracellular transport.

## Materials and Methods

### Strains and growth conditions

The characterization of Chs3 was performed using several *S. cerevisiae* strains, most of which were created in the W303 background. These included the strains CRM103 (W303 Mat a *chs3::URA3*), CRM892 (W303 *chs4::HIS3 chs3::URA3*), CRM1348 (W303 *chs3::URA3 chs7::natMx4*) and MMY1012 (W303 *rer1::KanMx4 chs3::LEU2*). For some experiments, additional genetic backgrounds were used, such as those of strains CRM921 (BY4741 *end4::kanMx4*), CRM926 (BY4741 *end4::KanMx4 chs3::URA3*), MMY981 (Mat a *ret1-1 chs3::LEU2*) and RH7016 (*ERV14-mCi::SpHIS5 ura3 leu2 his3 trp1*) (Castillon et al., 2009).

All strains used contained a single copy of *CHS3* and were made by transforming the appropriate *chs3* $\Delta$  strains with the different constructs of Chs3, expressed from their own promoter in centromeric plasmids. Where required, *CHS7* was additionally overexpressed from pRS423::*CHS7* or pRS424::*CHS7*, which were introduced into the strains expressing the different constructs of *CHS3*.

Yeast cells were typically grown at 28°C, except for the *end4* $\Delta$  and *ret1-1* mutants, which were grown at 25 °C. YEPD (1% Bacto yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) or SD medium (2% glucose, 0.7 % Difco yeast nitrogen base without amino acids) supplemented with the appropriate amino acids were used as growth medium. When required, the media were supplemented with hygromycin, nourseothricin or geneticin at the standard concentrations. Calcofluor resistance was tested by a plate assay on SD media buffered with 50 mM potassium hydrogen phthalate, pH 6.2, as described (Trilla et al., 1999).

### Plasmids

The plasmids used in this work are listed in Supplementary Materials Table S1. All *CHS3* mutants were generated by site-directed mutagenesis, as described (Trilla et al., 1999), using plasmid pRS315::*CHS3*-GFP as template. The N-terminal truncations were generated using long synthetic oligonucleotides, which created the deletion loops upon hybridization with the template. All constructs were confirmed by direct sequencing. The HA-tagged and untagged versions of the truncated forms of *CHS3* were constructed by replacing the N-terminal regions of pRS315::*CHS3*-3xHA and pRS315::*CHS3* with the corresponding regions from the truncations using the SpeI site from the polylinker and the internal HindIII site of *CHS3*.

*CHS7* was cloned as an EcoRI-SacI fragment from pRS426::*CHS7* (Trilla et al., 1999) into the pRS423 and pRS424 plasmids.

Plasmids expressing the different N-terminal fragments of Chs3 were generated by amplifying the corresponding fragments by PCR and cloning them into

the vector pETGEXCT (Sharrocks, 1994) using NcoI/SacI restriction sites to give pETGEXCT-*CHS3*<sup>1-171</sup> and pETGEXCT-*CHS3*<sup>126-171</sup>. The C-terminus tail comprised the last 55 amino acids of *CHS3* and was cloned between the EcoRI and XhoI restriction sites of pGEX-6P-1.

#### Protein extracts and immunoblotting

Total cell lysates from a 30-ml logarithmic culture were prepared by glass-bead lysis (Fast prep FP120, BIO101) in 150 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0.1% Triton, 150 mM NaCl) with 1x protease inhibition cocktail (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin). Cell debris was removed by centrifugation (5 min, 1000 xg, 4°C) and the supernatant was boiled for 5 minutes with 4 × SDS loading buffer. 100 µg of protein was subjected to 7.5 % SDS-PAGE separation and transferred to PVDF membranes (Trilla et al., 1999). After blocking with 5% skim milk, the membranes were incubated with anti-HA 12CA5 (Roche) or anti-GFP JL-8 monoclonal antibodies (Living colors, Clontech). Rabbit polyclonal antibody against Pma1 (Serrano et al., 1986) was used as a marker for PM fractions in subcellular fractionation experiments. Other blots were developed with anti-Gas1 (Nuoffer et al., 1991) or anti-6xHIS (H-15, Santa Cruz) antibodies. Blots were developed using the ECL kit (GE Healthcare).

Subcellular fractionations were performed on discontinuous sucrose gradients as previously described (Reyes et al., 2007).

#### Co-Immunoprecipitation (co-IP)

The direct interaction between Chs3 molecules was determined by co-IP as follows: cells from 100 ml of logarithmically growing cultures were harvested by centrifugation and washed with cold water. Cells were lysed as described above in 200 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Triton, 150 mM NaCl) containing 1x protease inhibitor cocktail (1 mM PMSF, 1 µg/ml aprotinin, 1 µg/ml leupeptin), and the lysates were cleared of cell debris (5 min, 16,000 x g, 4°C). Two mg of total protein from cell lysates was brought up to 400 µl with IP buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1% Triton, 150 mM NaCl, 2 mg/ml BSA). This suspension was incubated with anti-HA HA1.1 (Covance) at 1:75 dilution at 4 °C for 2 h, and then mixed with 50 µl of 0.1 mg/ml of Protein A Sepharose (GE Healthcare) and incubated for a further 2 h. Alternatively, the polyclonal α-GFP (Invitrogen) was used for co-IP at 1:100 dilution. The beads were washed three times with lysis buffer and boiled with 4 × SDS loading buffer for 5 min. Twenty µl of the samples was separated by 7.5% SDS-PAGE, and the proteins were visualized by immunoblotting, as indicated above.

The interaction of Chs3-3xHA with Erv14-mCi or Rer1-GFP (Sato et al., 2001) at the ER was tested in co-IP experiments as follows: cells containing the indicated constructs were lysed in 800 µl of TNE (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5mM EDTA) supplemented with 1x protease inhibitor cocktail. Lysates were then centrifuge at 1000xg for 5 minutes at 4°C, followed by a second centrifugation at 13000xg for 15 minutes at 4°C. The ER fraction pelleted was re-suspended in 1 ml of TNE and membranes were solubilized by adding 225 µl of 5% TNED (TNE with 5% of digitonin) and incubating for 1 hour at 4°C. Non-solubilized membranes were removed by ultracentrifugation at 100000xg for 1 hour at 4°C. 100 µl of GFP-Trap (Chromtek) beads at 20% in TNE was added to 900 µl of the supernatant and incubated for 3 hours at 4°C. The beads were washed twice with 1000 µl of TNED 1% and a further two times with 0.2% TNED. Finally, the beads were dried and bound proteins were eluted in 50 µl of sample buffer and analyzed by immunoblotting.

#### Protein purification and pull-down assays.

All the protein fragments used for the pull-down assays were expressed in Rossetta *E.coli* cells by the addition of 0.5 mM IPTG and growth at 37°C for 4 hours. Cultures were washed once with ice-cold water and stored at -80°C. The N-terminus domain of Chs3 tagged with 6xHis was expressed from pCR-T7/Ct-TOPO-*CHS3*<sup>1-171</sup>-6xHis (Trautwein et al., 2006) and purified under native conditions using Ni-NTA resin (Qiagen). The final elution step was done with 250 mM Imidazol. GST-tagged fragments were purified from *E. coli* cells lysed in PBS/5% Glycerol. Extracts were then incubated with GSH agarose (GE Healthcare) and eluted with 40 mM GSH. Purified proteins were later dialyzed against PBS/5% Glycerol for the subsequent pull-down assay, which was carried out as follows. GST-fusions were immobilized on GSH-agarose and incubated for 2 hours at 4°C with purified Chs3-6xHis in 20 mM HEPES pH 6.8 and 150 mM NaCl. Finally, the coupled resin was washed 3 times with 20 mM HEPES pH 6.8 and 150 mM NaCl, and then resuspended in 100 µl SDS sample buffer, followed by incubation at 95°C for 5 min. Samples were analysed by Coomassie staining and Western Blot.

#### Endoglycosidase H treatment

EndoH treatment was performed as previously described (Cos et al., 1998). Briefly, 20 ml of exponentially growing cells was processed as described above for protein immunoprecipitation with anti-HA. After incubation of the protein extracts with Protein A Sepharose, the beads were washed twice with 50 mM citrate buffer, pH 5.5, and were resuspended in 200 µl of 50 mM citrate buffer, pH 5.5. 100 µl of this suspension was boiled with 4 × SDS loading buffer and the remaining 100 µl was treated overnight at 37°C with 10 mU EndoH (Boehringer). The beads were washed twice with lysis buffer and boiled in 50 µl of 4 × SDS loading buffer, and 20 µl of the samples was loaded on a 6.5% SDS- PAGE gel and subjected to immunoblot analysis.

#### Cross-linking assays

Cross-linking was carried out according to Kota (Kota and Ljungdahl, 2005). Twenty ml of culture was harvested, washed in cold water, and resuspended in 150 µl of PBS, pH 7.4. After breakage of the cells with glass beads and the removal of cell debris by centrifugation (5 min, 16000 x g, 4°C), 10 µg of protein was treated with DSP crosslinker (Pierce) at concentrations ranging from 0.01 to 0.1 mM for 30 minutes at 22 °C. Samples were treated with 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, for 30 min at 22 °C to neutralize free reactive groups. Control samples were additionally treated with 40 mM DTT for 30 min at 37°C. Finally, all samples were boiled for 5 min with loading buffer prepared without β-mercaptoethanol. 15 µl of the samples was separated on a 6.5% SDS-PAGE gel.

#### Blue native gel electrophoresis

Cells from a 50-ml culture were resuspended in 500 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM EDTA) and were lysed with glass beads. Cell debris was removed by centrifugation (10 min at 3,000 x g, 4 °C) and membranes were pelleted by high-speed centrifugation (21,000 x g, 20 min 4 °C). The supernatant was removed and the membranes were resuspended in 100 µl of 15% glycerol. Ten µg protein was solubilized in native PAGE 4x Sample buffer (Invitrogen) with either 1% Digitonin or 1% SDS. Samples were incubated for 30 min at 4°C in the case of Digitonin or RT in the case of SDS. Samples were centrifuged at 15,000 x g for 5 min at 4°C to remove non-solubilized membranes. The supernatant was supplemented with 0.25% Coomassie G-250 (Invitrogen) and loaded on 3-12% NativePAGE from Invitrogen. Proteins were

## Chs3 dimerization and trafficking

transferred to a PVDF membrane and visualized as described above for SDS-PAGE.

#### Yeast two-hybrid analysis.

The *CHS4* coding region and the indicated truncations of *CHS3* were amplified by PCR and cloned in-frame into the pAS2 and the pACT2 plasmids (Harper et al., 1993) using the NcoI and SmaI restriction sites. The pACT2 and pAS2 constructs were transformed into strain Y190 and the interaction was assessed by the determination of  $\beta$ -galactosidase levels. Qualitative determination of  $\beta$ -galactosidase activities was carried out by transferring colonies onto a nitrocellulose filter, and lysing them by freezing in liquid nitrogen. The filters were then placed on a plate containing Z-buffer and X-Gal to analyze enzyme activity by the appearance of blue colour. Quantitative measurements of  $\beta$ -galactosidase activity were performed directly in cell extracts using the substrate o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) in Z buffer, as described (Rose et al., 1990).

#### Microscopy

Imaging was carried out using a Leika RX150 epifluorescence microscope equipped with an Orca-ER digital camera. Images were processed using the ImageJ software (NIH) and mounted with Adobe Photoshop CS. All images in the series were acquired under identical conditions and processed in parallel to maintain relative intensities.

For chitin staining, cells were grown in the presence of 50  $\mu$ g/ml calcofluor for 2 h. Yeast cells expressing GFP-tagged proteins were grown to early logarithmic phase in SD supplemented with 0.2 % adenine and observed directly under the microscope. Where indicated, cells were incubated with the actin-depolymerizing drug Latrunculin A (15  $\mu$ M) for at least 30 minutes. The vacuole was labelled by incubating the cells in the presence of FM4-64 (30  $\mu$ M) for 1 hour.

#### Chitin content and chitin synthase activity

Chitin levels were measured as described (Trilla et al., 1999). In brief, chitin was digested with chitinase (Sigma-Aldrich) and the N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) released from the reaction was determined colorimetrically.

For the determination of chitin synthase activity, cell membranes were prepared as described (Choi and Cabib, 1994). The enzymatic assay was performed with (total activity) and without (basal activity) trypsin treatment and in the presence of  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Co}^{2+}$ , allowing the specific measurement of CSIII activity. Activity was expressed as mU/hour/mg protein.

#### Acknowledgments

We thank R. Valle and V. Casquero for technical assistance, and M. Trautwein for his generous help with the MS analysis. C.S. is grateful to P.O. Ljungdahl for materials and helpful discussions. We acknowledge support of C.S. by a FPU fellowship from the MEC. A.R. was supported by a EMBO short term fellowship and by the JCyL grant GR231, and JML by an University of Seville fellowship. Work in the Spang Lab was supported by the University of Basel and the Swiss National Science Foundation. This research was supported by the Spanish CICYT grants BIO2007-60779 and BFU2010-18632 to C.R. and BFU2008-04119 and BFU2011-24513 to MM, and by the Junta de Andalucía grant P09-CVI-4503 to M.M.

#### References

- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J. and Zhou, H. (2008). A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis." *Mol. Cell Proteomics* **7**, 1389-1396.
- Atanassov, I. I., Pittman, J. K. and Turner, S. R. (2009). Elucidating the mechanisms of assembly and subunit interaction of the cellulose synthase complex of *Arabidopsis* secondary cell walls. *J. Biol. Chem.* **284**, 3833-3841.
- Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M. and Lodge, J. K. (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **4**, 1902-1912.
- Barfield, R. M., Fromme, J. C. and Schekman, R. (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4985-4996.
- Breidenbach, M. A., Palaniappan, K. K., Pitcher, A. A. and Bertozzi, C. R. (2012). Mapping yeast N-glycosites with isotopically recoded glycans. *Mol Cell Proteomics* **11**.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S. J. (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **108**, 1665-1672.
- Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M. and Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* **10**, 186-200.
- Choi, W. and Cabib, E. (1994). The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthases. *Anal. Biochem.* **219**, 368-372.
- Copic, A., Starr, T. L. and 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, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E. and Roncero, C. (1998). Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* **256**, 419-426.
- Dancourt, J. and Barlowe, C. (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 777-802.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E. M., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. and Pringle, J. R. (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **139**, 75-93.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S. and 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.
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J. and Pelham, H. R. (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol. Cell. Biol* **9**, 3383-3397.
- Kim, H., Melen, K., Oesterberg, M. and von Heijne, G. (2006). A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 11142-11147.
- Kota, J., Gilstring, C. F. and Ljungdahl, P. O. (2007). Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J Cell Biol* **176**, 617-628.

- Kota, J. and Ljungdahl, P. O.** (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell Biol.* **168**, 79-88.
- Lam, K. K., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G. and Conibear, E.** (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* **174**, 19-25.
- Lenardon, M. D., Milne, S. A., Mora-Montes, H. M., Kaffarnik, F. A., Peck, S. C., Brown, A. J., Munro, C. A. and Gow, N. A.** (2010). Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *J. Cell Sci.* **123**, 621-629.
- Letourneur, F., Hennecke, S., Démolière, C. and Cosson, P.** (1995). Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E. *J. Cell Biol.* **129**, 971-978.
- Li, X., Gerber, S. A., Rudner, A. D., Beausoleil, S. A., Haas, W., Villen, J., Elias, J. E. and Gygi, S. P.** (2007). Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteom. Res.* **6**, 1190-1197.
- Meissner, D., Odman-Nareh, J., Vogelpohl, I. and Merzendorfer, H.** (2010). A novel role of the yeast CaaX protease Ste24 in chitin synthesis. *Mol. Biol. Cell* **21**, 2425-2433.
- Merzendorfer, H.** (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *Eur. J. Cell Biol.* **90**, 759-769.
- Muñiz, M., Nuoffer, C., Hauri, H. P. and Riezman, H.** (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J. Cell Biol.* **148**, 925-930.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A. and Riezman, H.** (1991). Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein to the plasma membrane. *Mol. Cell Biol.* **11**, 27-37.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* **21**, 921-926.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A. and Roncero, C.** (2007). Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **120**, 1998-2009.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr. Genet.* **41**, 367-378.
- Roncero, C. and Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. *J. Bacteriol.* **163**, 1180-1185.
- Roncero, C. and Sanchez, Y.** (2010). Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast* **27**, 521-530.
- Rose, M. D., Wisnton, F. and Hieter, P.** (1990). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sacristan, C., Reyes, A. and Roncero, C.** (2012). Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol. Microbiol.* **83**, 1124-1135.
- Sanchatjate, S. and Schekman, R.** (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol. Biol. Cell* **17**, 4157-4166.
- Sato, K., Sato, M. and Nakano, A.** (2001). Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* **152**, 935-944.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R.** (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-ATPases. *Nature* **319**, 689-693.
- Sharrocks, A. D.** (1994). A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene* **138**, 105-108.
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Cabib, E.** (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J. Cell Biol.* **114**, 111-123.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E. and Spang, A.** (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J* **25**, 943-954.
- Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C.** (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **145**, 1153-1163.
- Valdivia, R. H., Baggot, D., Chuang, J. S. and Schekman, R.** (2002). The yeast Clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev. Cell* **2**, 283-294.
- Valdivia, R. H. and Schekman, R.** (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 10287-10292.
- Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E. and Duran, A.** (1991). *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **114**, 101-9.
- Valkova, C., Albrizio, M., Röder, I. V., Schwake, M., Betto, R., Rudolf, R. and Kaether, C.** (2011). Sorting receptor Rer1 controls surface expression of muscle acetylcholine receptors by ER retention of unassembled alpha-subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 621-625.
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R.** (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* **174**, 973-983.
- Zanolari, B., Rockenbauch, U., Trautwein, M., Clay, L., Barral, Y. and Spang, A.** (2011). Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.* **124**, 1055-1066.
- Ziman, M., Chuang, J. S. and Schekman, R. W.** (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.

## Chs3 dimerization and trafficking

# CAPÍTULO 3

**LA COMPARTIMENTALIZACIÓN EN EL CUELLO ES LA BASE MOLECULAR DEL RECICLAJE ENDOCÍTICO DE CHS3 DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO PERO NO DURANTE EL CRECIMIENTO HIPERPOLARIZADO**

---





## ANTECEDENTES

El establecimiento de la polaridad celular es esencial en dos fases vitales del ciclo de vida de la levadura, la división celular y la conjugación. En términos generales la polarización de proteínas de membrana se consigue gracias a dos procesos en perfecto equilibrio: un transporte de membrana dirigido hacia la zona de polarización compensado por la endocitosis, que evita difusión de las proteínas hacia otras zonas de la membrana.

Se ha propuesto que la reducida velocidad de difusión de las proteínas transmembranales de levaduras es uno de los factores que permite la polarización de las mismas, tanto en crecimiento vegetativo como en conjugación, siendo la v-SNARE Snc1 un caso claro de este tipo de regulación (Valdez-Taubas and Pelham, 2003). Durante el crecimiento vegetativo, Snc1 se localiza en la yema naciente o en el cuello de yemas grandes, y durante conjugación aparece concentrada en la punta de la proyección sexual. En ambos estadios la inhibición de la endocitosis resulta en la distribución homogénea de Snc1 por la MP. La polarización de Chs3, sin embargo, no se ajusta tan bien a este modelo. Durante el crecimiento vegetativo Chs3 también requiere del reciclaje endocítico para localizarse polarizadamente (Reyes et al., 2007), con la salvedad de que para que el equilibrio entre transporte y endocitosis sea posible, Chs3 necesita anclarse indirectamente al anillo de septinas a través de Chs4 y Bni4 (DeMarini et al., 1997; Reyes et al., 2007). En ausencia de Chs4, cuando Chs3 carece de anclaje físico al anillo de septinas, la tasa de endocitosis predomina sobre el aporte de nueva proteína lo que impide la concentración de Chs3 en el cuello. Por otro lado, durante conjugación, Chs3 aparece distribuida por toda la proyección del *shmoo* y no concentrada en la punta del mismo (Santos & Snyder, 1997). Estas observaciones sugieren que la polarización de Chs3 en estas dos fases del ciclo de vida de *S. cerevisiae* debe obedecer a distintas reglas.

En este trabajo realizamos un análisis microscópico detallado de los factores que dirigen la polarización de Chs3 durante la división celular y la conjugación, concluyendo que, a diferencia de lo que ocurre en vegetativo, durante el crecimiento hiperpolarizado la polarización de Chs3 es independiente de la endocitosis. Este trabajo además nos ha permitido describir la existencia de un dominio de membrana que se concentra en el cuello, en el cual reside Chs3, y que excluye a las proteínas transmembrana que se localizan en la MP lateral.

## OBJETIVOS

1. Profundizar en el mecanismo molecular que rige el reciclaje endocítico de Chs3 en el cuello.
2. Descifrar los factores que permiten la polarización de Chs3 durante el crecimiento vegetativo y la conjugación

## TRABAJO EXPERIMENTAL

### **Comparación de la distribución de los factores que dirigen la polarización de Chs3 durante el crecimiento vegetativo y la conjugación**

Mediante microscopía de fluorescencia llevamos a cabo un estudio comparativo entre el crecimiento vegetativo y conjugación de la distribución de los factores que determinan la polarización de Chs3, a saber: septinas, Chs4 y parches de endocitosis. Mientras que en crecimiento vegetativo los parches de actina, septinas y Chs4 se distribuían en la región del cuello coincidiendo físicamente con Chs3, durante conjugación encontramos cambios significativos en su distribución. Chs4 seguía colocalizando con Chs3, ocupando en este caso toda la proyección del *shmoo*; por el contrario, los parches de actina aparecían muy concentrados en la punta del *shmoo* y las septinas se localizaban como una banda en la base de la proyección.

Para analizar cómo este cambio en el patrón de distribución de las septinas y los parches de actina afectaba al comportamiento de Chs3, pasamos a analizar con más detalle cómo se establece el equilibrio entre transporte polarizado y la endocitosis en el cuello, para después compararlo con conjugación.

**En el cuello existe un acoplamiento entre transporte anterógrado y la endocitosis gracias a una disposición muy específica de las septinas y la zona de endocitosis.**

El análisis de la co-localización de las septinas respecto a los parches de actina reveló que ambas estructuras se disponen en dos círculos concéntricos, donde los parches de actina ocupan la posición más externa. Chs3, por su parte, se localiza en la superficie de membrana delimitada entre ambos anillos, a no ser que inhibamos la endocitosis o despolaricemos los parches de actina, situaciones que conducen a la deslocalización de Chs3 por la MP lateral. De acuerdo con estas observaciones, proponemos que el transporte polarizado de Chs3 hacia la región de membrana delimitada en la zona del cuello, le permitiría a Chs3 anclarse físicamente a las septinas a través de Chs4 y Bni4, lo que impediría que fuera endocitada por los parches de actina situados externamente al anillo de septinas. La liberación eventual de las moléculas de Chs3 ancladas a las septinas, determinaría que pudieran difundir libremente por la región delimitada entre los dos anillos, hasta que entraran en contacto con la maquinaria endocítica que promovería su internalización. De esta manera se establece un equilibrio perfecto entre el transporte anterógrado y la endocitosis de Chs3. Además, el anillo de parches de actina parece suponer un barrera que impide la difusión de las proteínas distribuidas por la MP lateral hacia el compartimento de membrana del cuello.

**El crecimiento hiperpolarizado de conjugación altera el reciclaje endocítico de Chs3**

Durante conjugación ocurre un desacoplamiento entre la zona de endocitosis y las septinas: los parches de actina pasan a concentrarse en la punta del *shmoo*, mientras que las septinas se sitúan en la base de la proyección. Además, a diferencia de lo que ocurre en vegetativo, la inhibición de la endocitosis no produce ningún efecto sobre la localización de Chs3, que se encuentra distribuida por toda la proyección del *shmoo*. Estos resultados sugieren que la polarización de Chs3 durante conjugación es independiente de la endocitosis, lo que conduce a la acumulación de la proteína en la MP. Curiosamente, el comportamiento de Chs3 durante la formación de hifas en *C. albicans* parece ser también independiente de la endocitosis, al menos durante las primeras fases de la polarización. Por tanto, la capacidad de Chs3 para escapar de la endocitosis podría suponer un mecanismo característico del crecimiento hiperpolarizado diseñado para lograr un incremento eficiente de los niveles de quitina, tal y como ocurre durante el desarrollo del micelio y durante la conjugación. Este mecanismo podría considerarse funcionalmente equivalente al bloqueo de la endocitosis de Chs3 que ocurre después de diferentes tipos de estreses.

# Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells

Carlos Sacristan, Abigail Reyes and Cesar Roncero\*  
*Instituto de Biología Funcional y Genómica and  
 Departamento de Microbiología y Genética.  
 CSIC/Universidad de Salamanca. Salamanca, Spain.*

## Summary

Yeast cells normally grow by budding, but under certain specific conditions they are also able to grow in hyperpolarized forms reminiscent of hyphal growth. During vegetative growth, the synthesis of the septum that physically separates yeast cells during cytokinesis depends on the correct assembly of the septin ring. Septins and actin patches are assembled at the neck, forming two concentric rings where the actin patch ring occupies the external-most part. This specific positioning defines a plasma membrane region at the neck from which other lateral membrane compartments are excluded. In this scenario, correct assembly of the chitin ring is dependent on the anchoring of Chs3 to the septin ring through Chs4. The anchoring of Chs3 to septins through Chs4 prevents the arrival of this protein at endocytic sites, thus reducing the endocytosis of Chs3. This allows an equilibrium to be set up between the antero- and retrograde transport of Chs3, facilitating the synthesis of the chitin ring at the neck. In contrast, hyperpolarized growth is characterized by a reduced endocytic turnover of Chs3, which in turn lead to the accumulation of Chs3 at the plasma membrane and a concomitant increase in chitin synthesis.

## Introduction

Yeast cells can switch between different forms of growth, including budding, mating and sporulation. In all these cases, cell integrity is maintained by the cell wall, an essential cellular structure that surrounds the yeast cell (Levin, 2005). A key element in yeast cell walls is chitin, which acts as scaffold for the assembly of the rest of the

components of the structure (Kollar *et al.*, 1997). In yeast, but also in some other fungi (Munro and Gow, 2001; Banks *et al.*, 2005), most cellular chitin is synthesized by Chitin Synthase III, whose catalytic subunit is Chs3. CSIII activity depends on the arrival of Chs3 at the PM, a process that is facilitated by other accessory Chs proteins (Roncero, 2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, chitin synthesis differs significantly among the different forms of growth, which suggests specific mechanisms for the regulation of this activity (Roncero, 2002). This has been demonstrated during sporulation, in which the function of Chs4 during vegetative growth is replaced by Shc1, a homologue of Chs4 that is specifically induced during sporulation and that has partially redundant functions (Sanz *et al.*, 2002). Many years ago it was observed that chitin synthesis increases during mating, the polymer locating to the base of shmoo (Schekman and Brawley, 1979). More recently, it has been shown that chitin synthesis during mating depends on Chs4, Chs5 and Chs7, similar to what occurs during vegetative growth (reviewed in Roncero, 2002), although very little is known about CSIII regulation during this process.

The synthesis of chitin during budding is a relatively well known process. Most chitin is assembled in a chitin ring at the mother side of the neck. This ring, although fully dispensable for cytokinesis, becomes essential when this process is minimally altered under a variety of conditions (Gomez *et al.*, 2009; Roncero and Sanchez, 2010). Its synthesis depends on the activation of CSIII at the PM but also on the anchoring of this activity to the neck, both processes being directly linked to the function of Chs4 (Trilla *et al.*, 1997; Sanz *et al.*, 2004; Reyes *et al.*, 2007). Chs4 is required for CSIII activation through an unknown mechanism, but Chs4 also interacts with Bni4, and this with the septin ring (DeMarini *et al.*, 1997; Kozubowski *et al.*, 2003), allowing correct assembly of the chitin ring (Sanz *et al.*, 2004). Chs3 is transported to the PM by the low-density pool of transport vesicles together with many other proteins (Sanchatjate and Schekman, 2006) and is later endocytosed (Holthuis *et al.*, 1998). However, contrary to most proteins Chs3 is not delivered to the vacuole but instead is recycled to the TGN, from where it will eventually be delivered again to the PM (Valdivia *et al.*,

Accepted 25 January, 2012. \*For correspondence. E-mail crm@usal.es; Tel. (+34) 923 294733; Fax (+34) 923 224876.

© 2012 Blackwell Publishing Ltd

2002). A proper endocytic turnover of Chs3 is critical for the regulation of chitin synthesis, at least during vegetative growth. It has recently been shown that this turnover depends not only on the endocytic machinery but also on Chs4 function (Reyes *et al.*, 2007), although it is not known whether the role of Chs4 depends on its activating and/or anchoring functions.

The close relationship between endocytic recycling and protein polarization in yeast was established many years ago using the yeast mating process as a model (Valdez-Taubas and Pelham, 2003). However, further work indicated that not all proteins behaved in the same way (Proszynski *et al.*, 2006), which was explained in terms of alternative mechanisms in the maintenance of protein polarity during mating. In addition, there is no clear evidence indicating whether the same mechanisms are used during budding growth. Two recent reports, using completely different approaches, have addressed the mechanisms involved in the maintenance of Cdc42 polarity during the cell cycle. Apparently, endocytosis-mediated polarization can only be applied mechanistically to proteins with slow diffusion rates at the PM, thus excluding Cdc42 owing to its very rapid diffusion rate (Layton *et al.*, 2011). This model, initially theoretical, has recently been partially confirmed experimentally (Orlando *et al.*, 2011). However, there are still many unanswered questions in the field, since most of the proteins studied as models are directly or indirectly involved in the polarization process itself. In addition, no extensive studies have been carried out to compare the behaviour of PM proteins during vegetative growth or mating. A unique case in such studies is Wsc1, which is an integral PM protein that acts as a cell wall stress sensor and is therefore not involved in polarization itself (Levin, 2005). It localizes to the site of growth and its polarization has been shown to be fully dependent on endocytosis (Piao *et al.*, 2007). However, the localization of Wsc1 during mating has not been addressed.

Within this scenario Chs3 seemed to offer an alternative tool to study the relationship between polarization and endocytosis in yeast. Chs3 is an integral PM protein that behaves as a typical cargo protein delivered to the PM in a polarized fashion (Reyes *et al.*, 2007) and that is expressed both during vegetative growth and mating (Cos *et al.*, 1998); this allows comparisons to be made between both types of growth. In addition, Chs3 is mostly retained at the neck, providing a different view of how endocytosis might regulate protein trafficking around the neck region.

In the present work we describe the behaviour of Chs3 at the PM during budding and the different forms of hyperpolarized growth. We show that while the endocytic turnover of Chs3 is critical for protein localization during budding, the polarization of Chs3 during mating becomes mostly independent of its endocytic turnover. The analysis of Chs4 function during mating and budding explains the

specific role of this protein in the regulation of Chs3 endocytosis at the neck, providing the basis for a mechanistic model that could explain the endocytic behaviour of other proteins.

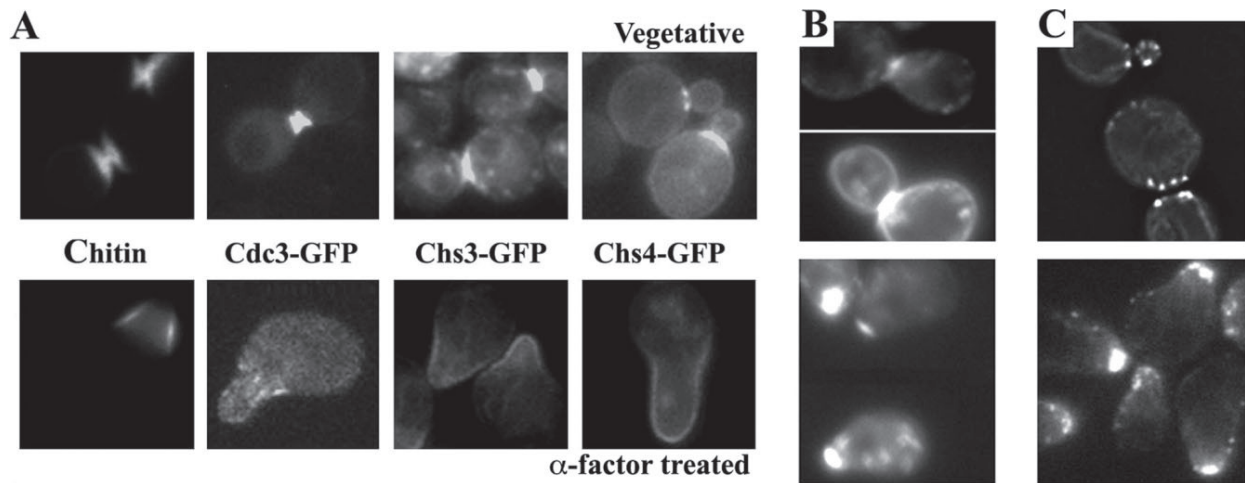
## Results

### *Cellular hyperpolarization apparently alters the intracellular behaviour of Chs3*

We have previously demonstrated that proper synthesis of the chitin ring during vegetative growth depends on the correct endocytic turnover of Chs3, which is dependent at least on Chs4 function and on the endocytic machinery associated with actin patches (Reyes *et al.*, 2007). In addition, it has been known for many years that conjugation increases chitin synthesis, accompanied by an accumulation of the polymer at the base of shmoo (Schekman and Brawley, 1979). In light of these lines of evidence, we were interested in testing whether an alteration of the endocytic turnover of Chs3 during mating might be linked to the described effect on chitin synthesis and, if this indeed occurs, what the molecular reasons for the differences between vegetative growth and mating are.

First, we determined whether our hypothesis might be correct by comparing Chs3 localization during vegetative growth and mating. During the former (Fig. 1A, upper row), a direct correlation was seen between the localization of septin Cdc3, Chs4, Chs3 and the chitin ring, as has been documented in independent works. During mating, mimicked experimentally throughout our work by  $\alpha$ -factor treatment, chitin apparently colocalized with septin Cdc3, which acquired a characteristic barred distribution (Fig. 1A, lower row) (Versele and Thorner, 2005). However, Chs3 as well as Chs4 were distributed uniformly along the mating projection, even in zones where chitin synthesis was not apparent (Fig. 1A, lower row). In addition, the localization of Chs3 in intracellular structures was not apparent and neither Chs3 nor Chs4 seemed to colocalize with septins. These results constitute preliminary but promising evidence about differences in the regulation of Chs3 during mating.

In order to determine whether these differences were related to the endocytic turnover of Chs3 or not, as an initial approach we next determined the apparent sites of endocytosis by analysing the early stages of FM4-64 internalization (Zonia and Munnik, 2008). During vegetative growth, the FM4-64 signal labelled vesicles in the vicinity of the PM but, also, the fluorescence appeared concentrated at the neck region (Fig. 1B). During polarized growth, the FM4-64 signal concentrated at the tip of the projection, revealing an apparently narrow region of endocytosis. This distribution was fairly similar to that of



**Fig. 1.** Cellular effects of switching from budding growth to mating in *S. cerevisiae*. A. Chitin was visualized after Calcofluor staining. The other images show the localization of the indicated proteins tagged with GFP. B. Fluorescence after staining with FM4-64. Cells were stained with 10–30  $\mu$ M FM4-64 at 4°C. At higher concentrations of FM4-64, fluorescence was distributed along the PM. C. Localization of actin after staining with Alexa Fluor-488 phalloidin. All images were acquired during vegetative growth (upper row) or after 2 h in the presence of  $\alpha$ -factor (lower row).

actin patches in both forms of growth (Fig. 1C), in agreement with current models of endocytosis (Robertson *et al.*, 2009). Interestingly, the actin patches and endocytic sites colocalized with Chs3 during vegetative growth but not during mating (compare images in Fig. 1B and C with those in Fig. 1A).

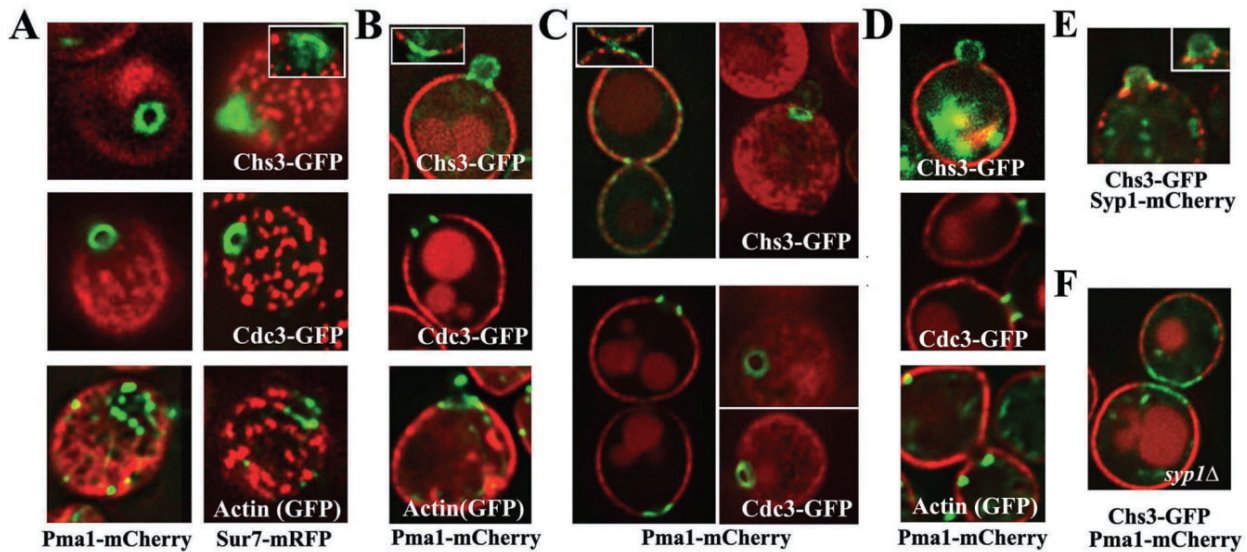
These results suggested that the physical relationship between Chs3 and the endocytic machinery could be different during mating, promoting a different endocytic turnover of Chs3 that could be associated with its broader distribution.

*Positioning at the neck: a physical link between the anchoring of Chs3 at the neck and endocytosis*

If our hypothesis were correct, the organization of the neck machinery during vegetative growth could be critical for the proper regulation of Chs3 and we therefore determined the specific positioning of Chs3, septin Cdc3 and actin patches with respect to other laterally distributed PM membrane proteins. We used two markers for different lateral membrane compartments: the H<sup>+</sup>-ATPase Pma1, which defines the MCP (Membrane Compartment Occupied by Pma1), and Sur7, a component of the MCC (Membrane Compartment Occupied by Can1), which is distributed in discrete patched structures, also called eisosomes (Grossmann *et al.*, 2007). Both compartments are non-overlapping (Lauwers *et al.*, 2007) and are excluded from the neck and the early emerging bud (Moreira *et al.*, 2009). Reconstructed frontal images revealed the presence of a clear Chs3–GFP ring at the neck that was

optically separated from the Pma1-mCherry and Sur7-mRFP signals. In addition, the images showed an empty ring between Chs3 and both PM proteins (Fig. 2A). Similar results were obtained in middle sections, where – consistently – a gap between the green and red signals was observed (Fig. 2B, see also Fig. S1). Septins act as the physical link of Chs3 to the neck (DeMarini *et al.*, 1997), but they also act as a barrier to physical diffusion (Caudron and Barral, 2009). Accordingly, we colocalized Cdc3–GFP with Pma1 and Sur7. Surprisingly, the exclusion zone between Cdc3–GFP and the PM markers was also clearly visible in frontal (Fig. 2A) and sectional (Fig. 2B, see also Figs S1 and S2) images. We later stained actin with Alexa fluor 488-conjugated phalloidin to position the actin patch ring with respect to Pma1 and Sur7. In this case, we did not observe an exclusion zone, the ring of actin patches appearing in physical contact with both PM proteins, as seen in frontal and middle sections (Fig. 2A and B). Very similar results were obtained for Gap1 (not shown) and hence it may be assumed that the exclusion region observed around the neck affects all laterally distributed transmembrane proteins.

From this evidence it may be deduced that it is the ring of actin patches that delimits the exclusion zone between Chs3/septins and lateral membrane proteins. If this hypothesis were correct, then the exclusion zone would be dependent on actin. The depolymerization of actin after latA treatment redistributed Chs3 along the PM (Fig. 2C), as described previously (Reyes *et al.*, 2007). More importantly, however, Pma1 diffused into the neck region, abol-



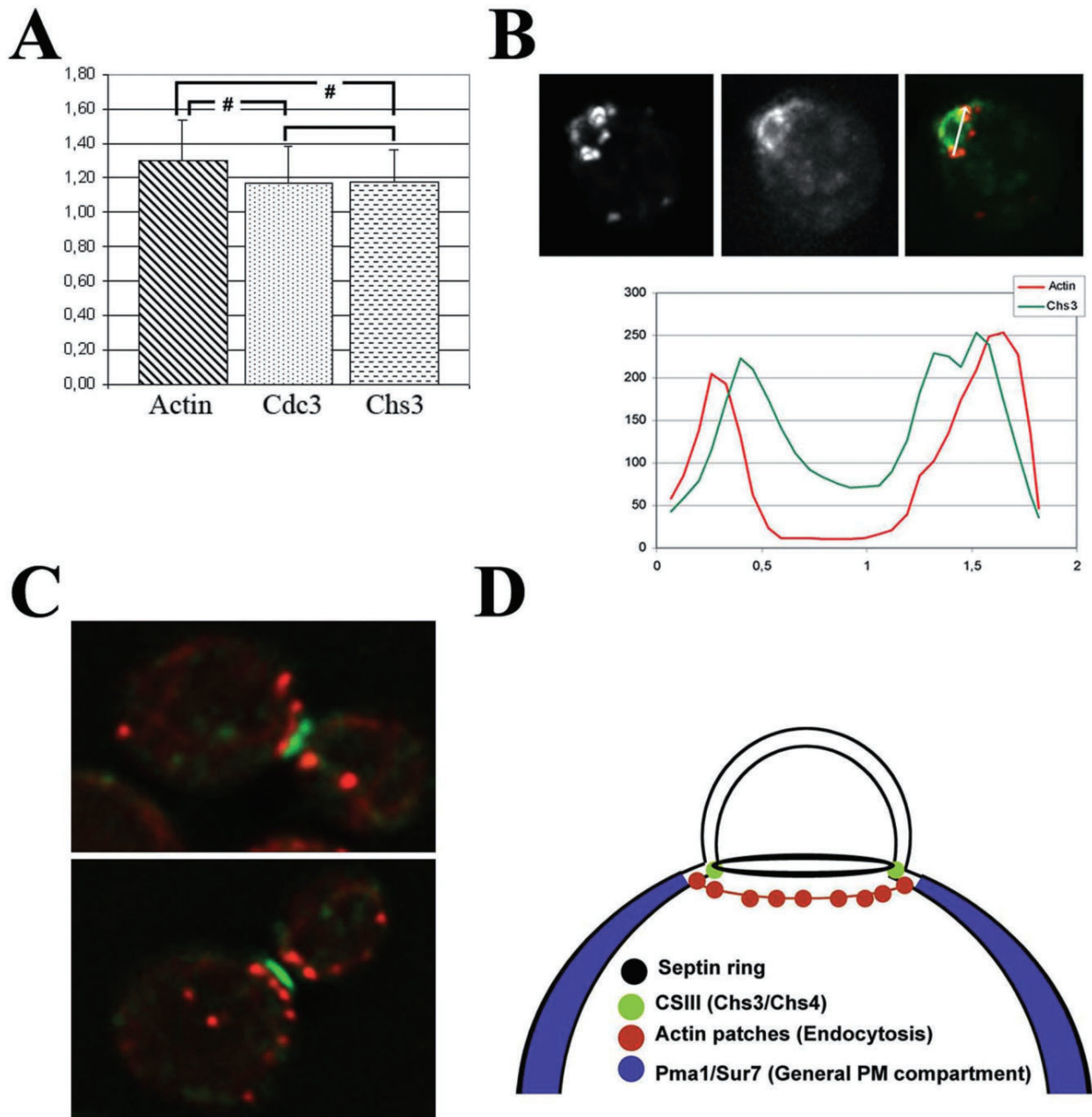
**Fig. 2.** Microscopic analysis of the assembly of the cellular machinery at the yeast neck. Colocalization of Chs3–GFP, Cdc3–GFP and actin patches with the PM markers Pma1–mCherry and Sur7–mRFP, as indicated in frontal reconstructed (A) or sectional images (B). Note the exclusion zone around the neck for the Pma1 and Sur7 proteins. C. Colocalization of Chs3–GFP and Cdc3–GFP with the PM marker Pma1–mCherry after latA treatment. Note the delocalization of Chs3 and the disappearance of the exclusion ring for Pma1 around the neck. D. Colocalization of Chs3–GFP, Cdc3–GFP and actin patches with the PM marker Pma1–mCherry after PI3K overexpression (see *Experimental procedures* for details). E. Colocalization of Chs3–GFP and Syp1–mCherry. F. Colocalization of Chs3–GFP with the PM marker Pma1–mCherry in the *syp1Δ* mutant. Note the partial delocalization of Chs3 and the disappearance of the exclusion ring for Pma1 around the neck. All images show living cells, with the exception of cells showing actin patches, which were fixed for Alexa fluor 488-phalloidin staining. See also Figs S1 and S2 for additional quantitative data.

ishing the previously described exclusion zone (Fig. 2C, see also Fig. S2B). Very similar results were obtained using the more stable neck marker Cdc3–GFP (Fig. 2C, see also Fig. S2A). In addition, depletion of PIP<sub>2</sub> by overexpression of the human PI3K kinase (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005) delocalized actin patches producing a redistribution of Chs3 from the neck and abolished PM compartmentalization around the septin ring (Fig. 2D, see also Fig. S2A). However, it could be argued that any of these treatments have pleiotropic effects and hence we tested the effect of Syp1 deletion. Syp1 interacts with septins (Qiu *et al.*, 2008), forming a distinct ring around the neck that allows the polarization of actin patches within the neck region (Fig. 2E). In the *syp1Δ* mutant, actin patches delocalized without significantly affecting the rate of endocytosis (Stimpson *et al.*, 2009), but Chs3 became partially redistributed from the neck along the PM and the exclusion zone from Pma1 disappeared (Fig. 2F, see also Fig. S2B). Apparently, the exclusion zone observed at the neck depends not only on the assembly of the actin patches, but also on their localization at the neck region.

The images described above also suggested the organization of the proteins in rings of different diameters, and this was indeed the case. While the diameters of the

Cdc3–GFP and Chs3–GFP rings were virtually identical, the diameter of the actin patch rings was significantly larger than those of Chs3 or Cdc3 (Fig. 3A). Moreover, the rings of actin patches always appeared outside those of Chs3 and had a larger diameter, as shown in the line-scan (Fig. 3B). Mid-sectional images (Fig. 3C) indicated that the actin patches were typically displaced to the mother side of the neck with respect to the Chs3 ring, which only became flanked at both sides very late during the cell cycle (Fig. 3B, lower image). Unfortunately, it became technically impossible to determine the diameter of the exclusion zone in a statistically representative number of cells.

The combination of optical and numerical data can provide a reliable model for the assembly of the different neck components (Fig. 3D). Based on previous evidence, septins would establish the physical localization of Chs3 through Chs4 and Bni4. Very likely most Chs3 would accumulate at the mother side because of the physical barrier to diffusion formed by the septins at the PM (Caudron and Barral, 2009). The actin patches would form a wider and more external ring on the mother cell, defining a second diffusion barrier that physically separates the neck compartment from the rest of the lateral plasma membrane proteins. Interestingly, the Chs3 ring appeared



**Fig. 3.** A model for neck organization.

A. Diameters of the actin patch, Cdc3 and Chs3 rings determined by fluorescence microscopy. The values are means of at least 40 cells and the standard deviations and statistical significance of the differences (#) are indicated.

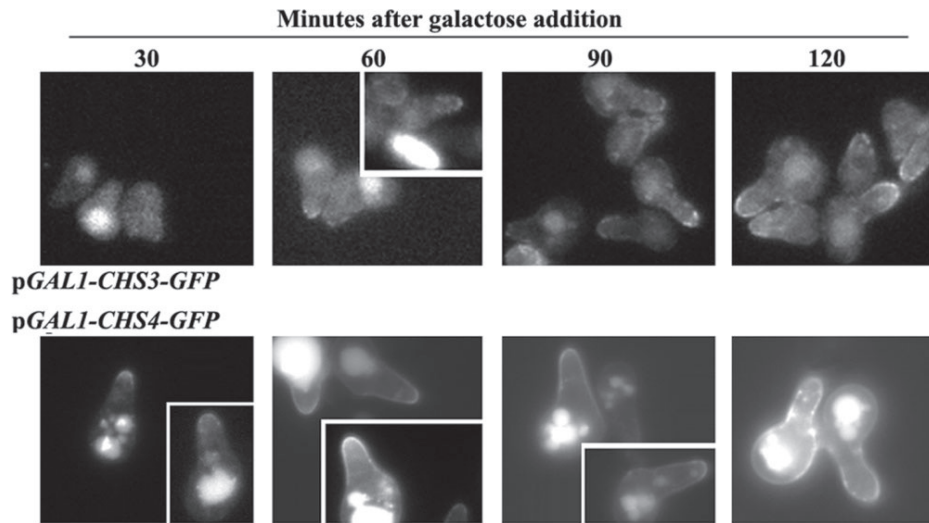
B. Colocalization of Chs3-GFP and actin patches (Alexa Fluor-568 phalloidin). Note the greater diameter of the actin patch ring and its more external positioning. The graph shows fluorescence intensity in both channels along the line labelled in the image.

C. Colocalization of Chs3-GFP and actin patches (Alexa Fluor-568 phalloidin) in light microscopy sections. Note the more external positioning of the actin ring as compared with that of Chs3.

D. A model for the distribution of the different proteins at the neck based on the images presented and on ring diameters (see text for a detailed description).

to be flanked by actin patches on both sides of the neck in cells finishing their process of cytokinesis (Fig. 3C, lower panel), clearly confirming the physical exclusion between the Chs3 and the actin patch ring.

It is expected that this organization would be responsible for the regulation of Chs3 endocytic turnover in a wt cell (see *Discussion* for further arguments) and hence this turnover would be altered in the absence of Chs3 anchor-



**Fig. 4.** Analysis of Chs3 and Chs4 polarization during mating. Cells containing the indicated plasmids were grown in raffinose medium to early logarithmic phase and then incubated for 2 h in  $\alpha$ -factor. Galactose at 2% was added to the mating medium and protein localization was assessed at the indicated times after induction (galactose addition). Note the initial staining at the tip that later expanded along the mating projections. Note also that Chs3 localization is restricted along the projection while Chs4 eventually diffuses to the cell body. See also Fig. S3 for a quantitative analysis of protein distribution.

age to the neck, as in the *chs4* $\Delta$  mutant (Reyes *et al.*, 2007), or after the depolymerization (Fig. 2C) or delocalization (Fig. 2F) of actin.

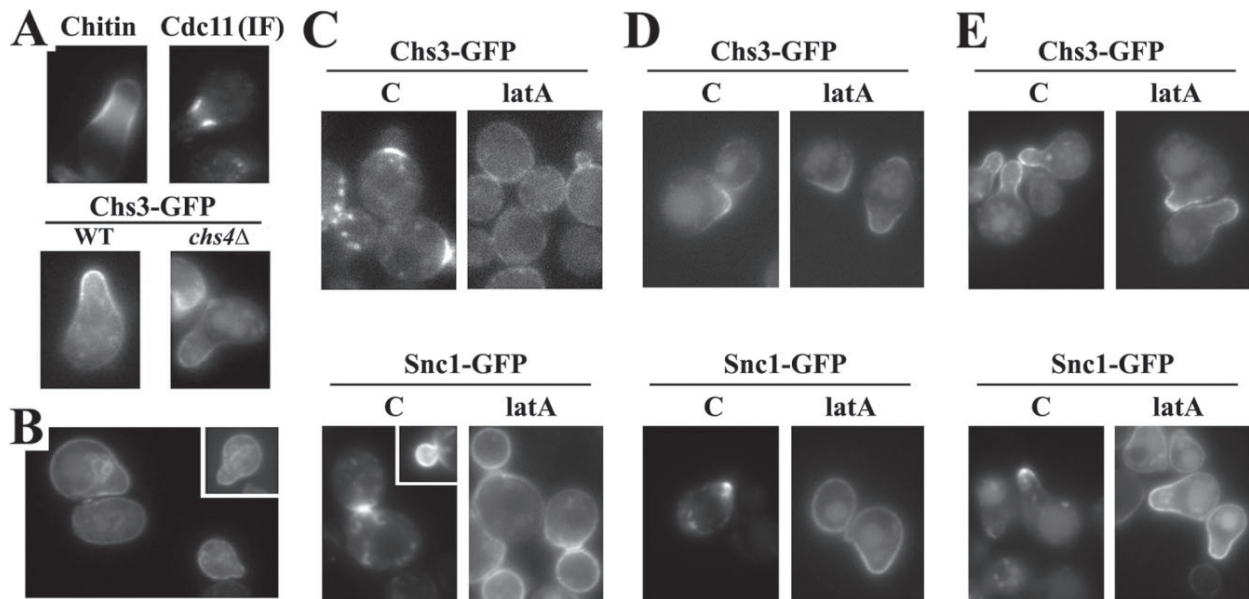
#### *Hyperpolarized growth alters the endocytic turnover of Chs3*

The next step focused on what occurs during mating, which would be necessarily different since *S. cerevisiae* cells grow in a hyperpolarized form without the presence of an apparent neck. During this form of growth, chitin synthesis increased three- to fourfold and chitin accumulated at the base of shmoos in a localization roughly similar to that of the septins (Fig. 1A). Chs3-GFP and Chs4-GFP were uniformly distributed along the mating projection, even at the tip regions devoid of chitin and septins (Fig. 1A), in sharp contrast with the perfect colocalization of chitin, septins and Chs3/Chs4 during vegetative growth (Fig. 1A). The first issue was to address how these proteins are delivered to the mating projection by using controlled expression from the *GAL1* promoter. Chs3 was visible at the tip of the mating projections approximately 60 min after induction and its distribution area increased steadily up to 120 min after induction, when it reached a maximum that was not affected by longer induction times (Fig. 4). The distribution area achieved was similar to that observed in mating cells grown overnight in galactose (see Fig. S3 for additional information). Chs4 seemed to be delivered in a similar way, since it was visible at the tip only 30 min after induction. Later, it became distributed along the projection

(Fig. 4). However, longer induction times produced a fairly uniform distribution throughout the cell membrane (Fig. 4, see also Fig. S3). Together, these results indicated that Chs3 and Chs4 were delivered to the tip of the mating projection, later becoming redistributed along the PM of the projection. However, at the base of the shmoos there seemed to be a physical barrier that was much more effective at blocking Chs3 than Chs4 diffusion to the body cell.

We have previously shown that Chs3 localization depends strictly on Chs4 and endocytic recycling during vegetative growth (Reyes *et al.*, 2007). Accordingly, we next addressed the role of both in the localization of Chs3 during mating. Chs4 is required for chitin synthesis during mating (Trilla *et al.*, 1997), but to our surprise Chs3 localization was apparently independent of Chs4 (Fig. 5A) and the protein accumulated at the PM in its absence, contrary to what occurs during budding (Reyes *et al.*, 2007). Very similar results were obtained during the hyperpolarized growth induced by the depletion of the mitotic cyclin dependent kinase Cdc28, where Chs3 was also distributed along the PM of the polarized projection, and its distribution was not affected by the absence of Chs4 (see Fig. S4). Thus, Chs3 localization at the PM during hyperpolarized growth did not require Chs4, suggesting that Chs3 polarization would be independent of endocytosis. To test this hypothesis, we compared the behaviour of Chs3 with that of Snc1, a transmembrane protein whose polarization has been shown to depend on endocytosis during both budding and mating (Valdez-Taubas and Pelham, 2003; Proszynski *et al.*, 2006). We first



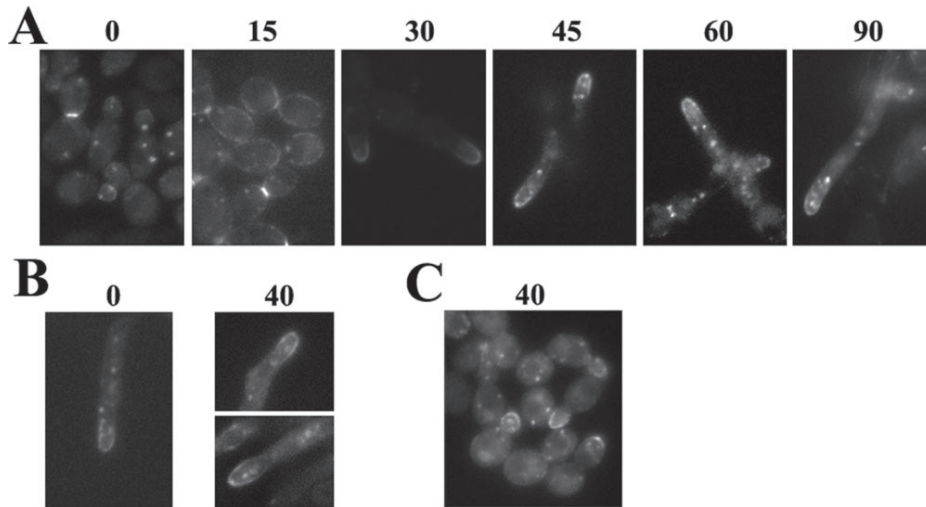


**Fig. 5.** Protein polarization and endocytic turnover during mating. A. Wild-type cells after 3 h of  $\alpha$ -factor treatment. Chitin was visualized by Calcofluor staining, and Cdc11 by IF. Chs3–GFP localization was assessed in living cells in wt or *chs4* $\Delta$  strains. B. Chs3–GFP does not polarize in the *end4* $\Delta$  mutant after  $\alpha$ -factor addition. C. Localization of Chs3–GFP and Snc1–GFP during vegetative growth before and after latA treatment. Note the rapid depolarization of both proteins. D and E. Effect of latA treatment on the localization of Chs3–GFP and Snc1–GFP during mating. Cells were treated for 25 min (D) or 120 min (E) with  $\alpha$ -factor before the addition of 15  $\mu$ M latA. Note the polarization of Chs3–GFP and Snc1–GFP, which is maintained after the latA addition for Chs3–GFP but not for Snc1–GFP. Images were acquired before (C) and 35 min after the addition of 15  $\mu$ M latA.

addressed Chs3 localization in the *end4* $\Delta$  mutant. Chs3 remained localized along the cell despite the formation of shmoos (Fig. 5B), similarly to what has been described for Snc1 (Proszynski *et al.*, 2006). Very similar results were obtained when  $\alpha$ -factor was added to cells pre-treated with latA (not shown). We next tested the effect of latA addition during the budding and mating processes. During vegetative growth, latA treatment abolished Chs3 and Snc1 polarization at only 35 min after its addition (Fig. 5C). In contrast, when latA was added at 25 (Fig. 5D) or 120 min (Fig. 5E) after  $\alpha$ -factor, the polarization of Chs3 remained stable after the same 35 min, but Snc1 polarization was severely altered since the protein was distributed along the cell. We also tested Chs3 localization in the yeast amphiphysin *rvs161* $\Delta$  mutant, which showed reduced rates of endocytosis (Munn *et al.*, 1995). Chs3 polarization was maintained during mating in the *rvs161* $\Delta$ , but also in the *syp1* $\Delta$  mutant or after PI3K overexpression (Fig. S5). Apparently, endocytosis is not required for the maintenance of Chs3 polarization during mating, as occurs for Snc1, but is required for triggering the polarization of both Chs3 and Snc1 at the beginning of hyperpolarized growth. Together, all this evidence suggests that the endocytic recycling of Chs3 is reduced during mating as compared with vegetative growth, explaining its higher

accumulation at the PM (not shown) and also its absence in intracellular structures (Figs 1 and 5).

At this point, we wondered whether this idea was also valid for other forms of hyperpolarized growth such as the switch between the yeast and mycelial growth patterns seen in *Candida albicans*. To address this question, we tagged a chromosomal copy of CaChs3 with the appropriate version of the GFP (see *Experimental procedures*). CaChs3–GFP localized to the neck and intracellular vesicles during yeast growth (Fig. 6A, leftmost panel), as previously described (Lenardon *et al.*, 2010). The induction of filamentous growth with FBS led to an immediate redistribution of Chs3 along the PM and, shortly after that, to the polarization of Chs3 towards the tip of the filamentous tube (Fig. 6A). The polarization of Chs3 persisted during the filamentation process and the accumulation of Chs3 at intracellular compartments became evident after filamentation had proceeded further (Fig. 6A, right panels). The addition of latA during filamentation produced hyphal tip swelling, although CaChs3 remained polarized after 40 min (Fig. 6B). Surprisingly, CaChs3 polarization still occurred when filamentation was induced in the presence of latA (Fig. 6C), although the formation of hyphae was almost completely abolished (not shown).



**Fig. 6.** Analysis of CaChs3–GFP localization in *C. albicans* during yeast or hyphal growth. *C. albicans* cells were grown in YEPD at 28°C as yeast and then filamentation was induced by the addition of 20% FBS and incubation at 37°C.

A. Localization of CaChs3–GFP at the indicated times after the induction of filamentation. Note the fast polarization of CaChs3–GFP and its accumulation in intracellular structures after 45 min in filamentation medium.

B. Localization of CaChs3–GFP in hyphal cells before and after 40 min in the presence of 50 μM latA. Note the tip swelling, but also the maintenance of CaChs3–GFP polarization.

C. Polarization of CaChs3–GFP 40 min after the induction of filamentation in the presence of 50 μM latA. CaChs3 is polarized despite the poor filament formation.

In conclusion, it seems that Chs3 polarization during hyperpolarized growth does not depend on its endocytic turnover, contrary what occurs during budding, suggesting a rapid and efficient mechanism for increasing the amount of CSIII at the PM and the concomitant increase in chitin synthesis reported during mating in *S. cerevisiae* and during hypha formation in *C. albicans*.

## Discussion

### *Chs3 as an alternative model to study cell polarity in yeast*

For many years *S. cerevisiae* has been a very useful tool for the study of cell polarity because its molecular genetics readily allows the possibility of unravelling the unknown aspects of this process. However, there are still many conflictive points in our understanding of how this process is regulated, and currently there is still some controversy about the specific role of endocytic turnover in the maintenance of polarity of some proteins.

Along this paper we have shown that Chs3 is an alternative model for the study of cell polarity in yeast. Chs3 is an integral PM protein whose delivery is highly polarized, both during vegetative growth (Reyes *et al.*, 2007) and during mating (Figs 4 and 5, this work). This polarization also seems to persist during alternative forms of hyperpolarization (Figs 6 and S4). Interestingly, our results indicate that the polarization of Chs3 at the PM follows different rules during vegetative and hyperpolarized

growth. While during budding the exquisite equilibrium between anterograde and retrograde transport is required for Chs3 polarization and its correct localization, during mating the anterograde transport of Chs3 is dominant, producing a polarized accumulation of Chs3 in the membrane. These differences make Chs3 localization fully dependent on Chs4 and endocytosis during budding, while it is independent of them during hyperpolarized growth.

### *Neck compartmentalization as a tool for regulating the endocytic turnover of Chs3*

During budding the physical distribution of different proteins at the neck would explain the specific role of the anchoring of Chs3 to the neck. The neck proteins studied here were distributed in fairly concentric rings, with the Chs3 and septin rings physically colocalizing, in clear agreement with previous observations (DeMarini *et al.*, 1997; Kozubowski *et al.*, 2003; Sanz *et al.*, 2004). Actin patches would form an external and wider ring. Our results suggest that the patches of actin constitute the physical limit for the lateral distribution of PM proteins such as Pma1 or Sur7, but also of Chs3, since the elimination of actin patches by latA or simply their depolarization in the absence of Syp1 (Stimpson *et al.*, 2009) abolished the exclusion zone for Pma1 around the neck, also promoting a redistribution of Chs3. But how does the actin ring delimit the neck compartment? One hypothesis

would be that the ring of actin patches assembled around the septins would act as a drainage ring, preventing the lateral diffusion of PM proteins and facilitating their endocytic recycling. In addition, it is likely that the positioning of actin patches would affect directly membrane composition, contributing to the generation of a physical barrier. In agreement with this proposal, the depletion of PIP<sub>2</sub> at the PM also abolished the compartmentalization of the neck membrane (Fig. 2D), in accordance with the proposed role for these lipids in membrane compartmentalization and their specific accumulation at the neck (Garrenton *et al.*, 2010).

How does Chs3 turnover regulation fit into this neck-membrane compartmentalized model? Chs3 is delivered to the neck by polarized transport, and in the presence of Chs4 it becomes properly anchored and would become physically separated from the endocytic region defined by the actin patch ring. Only the Chs3 molecules released from the septin ring would diffuse freely through the neck compartment, becoming endocytosed. This release was visualized in some cells as a gradient of Chs3–GFP from the neck (Fig. 2A, insert) and would probably be promoted by the incorporation of new molecules of Chs3 delivered by anterograde transport. Under normal circumstances, an equilibrium would exist between antero- and retrograde transport that would lead to the proper regulation of chitin synthesis. This equilibrium would probably be different between mother and bud cells and could explain the partially different behaviour of Chs3 in the late stages of the cell cycle (Zanolari *et al.*, 2011). In the absence of Chs4, Chs3 would not anchor to the neck and would therefore diffuse towards the actin patch ring and immediately become endocytosed. In this case, retrograde transport would be favoured, leading to an accumulation of Chs3 in intracellular vesicles (Reyes *et al.*, 2007). This is also likely to occur during the part of the cell cycle when Bni4 and Chs4 are not localized to the neck and Chs3 is only visible in intracellular structures (Kozubowski *et al.*, 2003).

#### *An escape from endocytosis: the behaviour of Chs3 during hyperpolarized growth*

Our results also clearly support the different behaviour of Chs3 during hyperpolarized growth. This behaviour can be envisaged as being similar to that reported after latA treatment (Reyes *et al.*, 2007) or PKC activation (Valdivia and Schekman, 2003) during vegetative growth, in which the anterograde transport of Chs3 is predominant, allowing the accumulation of Chs3 at the PM and a significant increase in chitin synthesis. Many explanations could be invoked to account for alterations in the equilibrium between the antero- and retrograde transport, but it is unlikely that a simple increase in Chs3 expression would

be responsible for this effect, because although such an increase is known to occur during mating (Cos *et al.*, 1998) it does not occur in the case of the *cdc28<sup>ts</sup>* mutant (Fig. S4) or during hypha formation in *C. albicans* (Kadosh and Johnson, 2005). Our results instead point to a reduced endocytosis of Chs3 during hyperpolarized growth, because Chs3 localization became independent of Chs4 (a known regulator of the endocytic recycling of Chs3 during budding), and was not affected in the *rvs161Δ* and *syp1Δ* endocytic mutants. In addition, it was unaffected by the endocytic blockade produced by latA treatment. This latter observation is in clear contrast to what occurs for Snc1, whose polarization depends directly on endocytic recycling (Fig. 5D and E; Valdez-Taubas and Pelham, 2003). Since both Snc1 and Chs3 depend on endocytosis for localization during budding, it seems clear that a reduced endocytic turnover of Chs3 during mating could explain the differences observed. However, we cannot exclude a specific increase in the anterograde transport of Chs3 during mating, which could partially contribute to its accumulation at the PM. This model seems valid for most, if not all, forms of hyperpolarized growth, since it is fully compatible with our results regarding *cdc28<sup>ts</sup>* mutants and the induction of filamentation in *C. albicans*. A seemingly contradictory result in this scheme is the absence of polarization of Chs3 (Fig. 5B) and Snc1 (Proszynski *et al.*, 2006) during mating in the *end4Δ* mutant. However, the biological functions of both proteins depend on an endocytic pool (Lewis *et al.*, 2000) that is depleted in *end4Δ* cells, and hence the *de novo* synthesis of these proteins does not seem sufficient for a polarized distribution to be achieved. However, CaChs3 remains polarized during filamentation in the presence of latA. The most plausible explanation is that incorporation of CaChs3 to the PM would depend to a greater extent on *de novo* synthesis than in *S. cerevisiae*.

The different behaviour of Chs3 and Snc1 during mating can be explained simply in terms of their different biological roles. Snc1 is an integral part of the machinery involved in polarized secretion and hence its localization should be maintained very precisely (Fig. 5E; Proszynski *et al.*, 2006) by its continuous recycling. However, Chs3 behaves strictly as a cargo and can therefore diffuse freely along the PM, diminishing its endocytosis. Although direct measurement of the diffusion rate of Chs3 at the PM has not been achieved, its rapid endocytosis in the absence of neck anchoring during budding suggests a rapid diffusion of the protein to access endocytic sites. Such a diffusion rate would discriminate Chs3 from other slow-diffusion rate proteins such as Snc1 (Valdez-Taubas and Pelham, 2003), thereby explaining the differences observed. These differences were not apparent during budding due to the anchoring of Chs3 to the septin ring, which delays its lateral diffusion (see above).

In conclusion, on the basis of our chitin synthase model we show that the different accessibility to the endocytic machinery during hyperpolarized or vegetative growth could be sufficient for the differential regulation of the endocytic turnover of a given protein. This provides not only a way to change the behaviour of a protein between budding or hyperpolarized growth but also to discriminate the behaviour of different proteins. In addition it could be envisaged as a general mechanism to modify protein accumulation at the PM during specific stages the yeast cell life cycle.

## Experimental procedures

### Yeast strains and plasmids

Most yeast strains used here were based on two different genetic backgrounds: W303 for vegetative growth and 15Daub (*bar1Δ*) for mating experiments. When required, gene deletions were made in the original strains using the gene replacement technique with different deletion cassettes based on auxotrophic markers (Reyes *et al.*, 2007) or *natMX4* resistance. *natMX4* resistance cassettes were used for *CHS3*, *CHS4* and *SYP1* deletions and were generated by PCR using pAG25 as template (Goldstein and McCusker, 1999). Similarly, Pma1 and Syp1 were tagged chromosomally at their C-terminus with mCherry, using an integrative cassette amplified from a pFA6-*natMX4* derivative (Hentges *et al.*, 2005). Sur7-mRFP strains were made by integrating the linearized Ylp211-SUR7mRFP, as described (Grossmann *et al.*, 2007).

The *C. albicans* CAI4-*CaChs3-GFP* strain was constructed as follows. *CaCHS3* was tagged chromosomally at its C-terminus with *eGFP3* using an integrative cassette constructed in several steps. First, the last 523 bp of the *CaCHS3* ORF were amplified with the CaCHS3-N1 (GTTAC CAGCAGCCATTAC) and CaCHS3-N2(SmaI) (GCTTTAAC CCAATCACCCGGGACTGGACCCTGAAGAAG) primers, and cloned into the pGEM-T (pGEM-T::CaCHS3Nt) plasmid. Then, the 3' region of CaCHS3 comprising the 839 bp from the stop codon was amplified with primers CaCHS3-C1(SmaI) (CTTCTTCAGGGTCCAGTCCCAGGGTGATTGG GTTAAAGC) and CaCHS3-C2 (GAGGTTTGACGTCAGTTG) and cloned into the pGEM-T (pGEM-T-CaCHS3Ct) plasmid. Following this, the *CaCHS3Ct* fragment was excised with XmaI/NcoI and subcloned into plasmid pGEM-T::CaCHS3Nt linearized with the same enzymes. In the resulting plasmid, which contained the reconstructed C-terminal region of *CaCHS3*, we introduced the *eGFP3* tag (Cormack *et al.*, 1997) as a SmaI/StuI fragment at the regenerated SmaI site immediately before the stop codon. Finally, *CaURA3* was subcloned as a NotI/XbaI fragment into a native SnaBI restriction site situated 251 bp downstream from the stop codon, affording the CRM964 plasmid. The integration cassette of about 3500 bp was excised from this plasmid with SacI/SphI and transformed into the CAI4 strain with the lithium acetate method. Transformants were selected on YNB w/o amino acids and confirmed by PCR with external oligonucleotides.

The *CHS3* and *CHS4* genes were always expressed from the centromeric plasmids pRS314 or pRS315 and protein

localization was always assayed in their corresponding gene-deleted strains. In contrast, Cdc3-GFP and Syp1-GFP were always observed in wt strains. Most of the plasmids used have been described previously.

For a complete list of the yeast strains and plasmids used through this work see Table S1.

### Media and growth conditions

*Saccharomyces cerevisiae* was grown in YEPD (1% yeast extract, 2% peptone and 2% glucose) or synthetic minimal medium (SC) (2% glucose and 0.7% yeast nitrogen base without amino acids) supplemented with the appropriate amino acids to maintain plasmid selection. Cells were incubated at 28°C, except for the *cdc28-13* mutant, which was typically grown at the permissive temperature of 25°C before shifting it to the restrictive temperature of 32°C. For galactose induction, the yeast strains were grown in 2% raffinose media to early logarithmic phase and induction was triggered by adding galactose at a final concentration of 2%. Proteins were visualized at different times after induction.

Mating was mimicked experimentally by  $\alpha$ -factor treatment in the 15Daub strains. Shmoo formation was usually assayed by adding  $\alpha$ -factor at 200 ng ml<sup>-1</sup> for 2 h, although shorter times of treatment were also used, as indicated. Endocytosis was blocked with latrunculin A at a final concentration of 15  $\mu$ M (Reyes *et al.*, 2007). Microscopic observations were begun 15 min after treatment. The effects of PI3K overexpression (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005) were typically determined 30 min after the addition of galactose.

*Candida albicans* cells were grown as yeasts in YEPD at 28°C. Hypha formation was induced by supplementing the growing media with 20% foetal bovine serum and further incubation at 37°C. Endocytosis in *C. albicans* was blocked using 50  $\mu$ M IatA.

### Microscopy

Calcofluor vital staining was observed in cells grown in the presence of 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> Calcofluor for 2 h at 28°C (Gomez *et al.*, 2009). Transformant cells expressing GFP, and the mCherry or mRFP fusions were grown in SD medium supplemented with 0.2% adenine and visualized directly by fluorescence microscopy in living cells. Cdc11 was immunolocalized as described (Sanz *et al.*, 2004), using an anti-cdc11 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) as primary antibody and an anti-rabbit antibody coupled to Alexa fluor 488 as secondary antibody (Invitrogen Molecular Probes, Carlsband, CA, USA).

For actin visualization, a 6 ml culture of cells was fixed with 2 ml of 16% formaldehyde (Polyscience, Warrington, USA) and 1 ml of PM Buffer (25 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 6.8, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>) for 1 h at 28°C under conditions of constant shaking. Cells were pelleted at 1800 g for 5 min and washed three times with PM buffer. They were then permeabilized by resuspending them several times in 1 ml of PM buffer supplemented with 0.5% Triton X-100. The detergent was removed with repeated washes and the cells were finally resuspended in 50  $\mu$ l of PM buffer. One microlitre of this cell suspension was incubated for 1 h in the darkness with 5  $\mu$ l of Alexa

Fluor-488 or Alexa Fluor-568 phalloidin prepared previously according to the manufacturer's instructions (Invitrogen Molecular Probes).

To mark the sites of endocytosis, typically FM4-64 was added at a 10  $\mu\text{M}$  concentration to the cell cultures. Immediately after the addition of FM4-64, cells were washed twice with cold SD medium and observed with fluorescence microscopy.

Most single-channel images were taken on a Leica RX150 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) epifluorescence microscope with a 100 W Hg lamp, using the appropriate filters, as described (Reyes *et al.*, 2007). Two-channel images were acquired on a DeltaVision device ( $\times 100$  objective; NA:1.40). Z-stack sections were collected at 0.20  $\mu\text{m}$  steps and later deconvoluted using Softworx (Applied Precision, Issaquah, Washington, USA). Additionally, frontal sections of the rings were volume-reconstructed using the same software. The images were then processed using Image J and Adobe Photoshop CS3 (San José, CA, USA) software. Linescans were performed in MetaMorph 7.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and the data were transferred to Microsoft Excel for further analysis.

When required, image measurements were evaluated statistically using Student's *t*-test for unpaired data. Analyses were performed using the SPSS Statics 17.0 (IBM, New York, USA) software. Significantly different values ( $P < 0.05$ ) are indicated (#).

### Acknowledgements

We thank M.I. Geli and J. Encinar for critical comments about the manuscript and for many years of fruitful discussions. Special thanks are due to W. Tanner, P.O. Ljungdahl, J.L. Revuelta, A. Spang, V. Cid and C.R. Vazquez for providing us with strains, plasmids and reagents; to R. Valle and V. Casquero for technical assistance, and to N. Skinner for language revision. C.S. was supported by a FPU fellowship from the MEC. This research was supported by the Spanish CICYT grants BIO2007-60779 and BFU2010-18632. Partial support from the JCyL through grants SA127A08 and GR231 is also acknowledged.

### References

- Banks, I.R., Specht, C.A., Donlin, M.J., Gerik, K.J., Levitz, S.M., and Lodge, J.K. (2005) A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **4**: 1902–1912.
- Caudron, F., and Barral, Y. (2009) Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell* **16**: 493–506.
- Cormack, B.P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N.A., Falkow, S., and Brown, A.J. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**: 303–311.
- Cos, T., Ford, R.A., Trilla, J.A., Duran, A., Cabib, E., and Roncero, C. (1998) Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**: 419–426.
- DeMarini, D.J., Adams, A.E.M., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J.S., and Pringle, J.R. (1997) A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139**: 75–93.
- Garrenton, L.S., Stefan, C.J., McMurray, M.A., Emr, S.D., and Thorner, J. (2010) Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 11805–11810.
- Goldstein, A.L., and McCusker, J.H. (1999) Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 1541–1553.
- Gomez, A., Perez, J., Reyes, A., Duran, A., and Roncero, C. (2009) Slr2 and Rim101 contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **8**: 1449–1559.
- Grossmann, G., Opekarová, M., Malinsky, J., Weig-Meckl, I., and Tanner, W. (2007) Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO J* **26**: 1–8.
- Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhaute, J., and Carr, A.M. (2005) Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **22**: 1013–1019.
- Holthuis, J.C., Nichols, B.J., and Pelham, H.R. (1998) The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Cell Biol* **9**: 3383–3397.
- Kadosh, D., and Johnson, A.D. (2005) Induction of the *Candida albicans* filamentous growth program by relief of transcriptional repression: a genome-wide analysis. *Mol Biol Cell* **16**: 2903–2912.
- Kollar, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., *et al.* (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1 $\rightarrow$ 6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1 $\rightarrow$ 3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17763–17775.
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D.J., and Tatchell, K. (2003) A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruit chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell* **14**: 26–39.
- Lauwers, E., Grossmann, G., and André, B. (2007) Evidence for coupled biogenesis of yeast Gap1 permease and sphingolipids: essential role in transport activity and normal control by ubiquitination. *Mol Biol Cell* **18**: 3068–3080.
- Layton, A.T., Savage, N.S., Howell, A.S., Carroll, S.Y., Drubin, D.G., and Lew, D.J. (2011) Modeling vesicle traffic reveals unexpected consequences for cdc42p-mediated polarity establishment. *Curr Biol* **21**: 184–194.
- Lenardon, M.D., Milne, S.A., Mora-Montes, H.M., Kaffarnik, F.A., Peck, S.C., Brown, A.J., *et al.* (2010) Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *J Cell Sci* **123**: 621–629.
- Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262–291.
- Lewis, M.J., Nichols, B.J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H., and Pelham, H.R. (2000) Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**: 23–38.

- Moreira, K.E., Walther, T.C., Aguilar, P.S., and Walter, P. (2009) Pil1 controls eisosome biogenesis. *Mol Biol Cell* **20**: 809–818.
- Munn, A.L., Stevenson, B.J., Geli, M.I., and Riezman, H. (1995) *end5*, *end6*, and *end7*: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **6**: 1721–1742.
- Munro, C.A., and Gow, N.A.R. (2001) Chitin synthesis in human pathogenic fungi. *Med Mycol* **39** (Suppl. 1): 41–53.
- Orlando, K., Sun, X., Zhang, J., Lu, T., Yokomizo, L., Wang, P., and Guo, W. (2011) Exo-endocytic trafficking and the septin-based diffusion barrier are required for the maintenance of Cdc42p polarization during budding yeast asymmetric growth. *Mol Biol Cell* **22**: 624–633.
- Piao, H.L., Machado, I.M., and Payne, G.S. (2007) NPFXD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol Biol Cell* **18**: 57–65.
- Proszynski, T.J., Klemm, R., Bagnat, M., Gaus, K., and Simons, K. (2006) Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J Cell Biol* **173**: 861–866.
- Qiu, W., Neo, S.P., Yu, X., and Cai, M. (2008) A novel septin-associated protein, Syp1p, is required for normal cell cycle-dependent septin cytoskeleton dynamics in yeast. *Genetics* **180**: 1445–1457.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A., and Roncero, C. (2007) Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J Cell Sci* **120**: 1998–2009.
- Robertson, A.S., Smythe, E., and Ayscough, K.R. (2009) Functions of actin in endocytosis. *Cell Mol Life Sci* **66**: 2049–2065.
- Rodríguez-Escudero, I., Roelants, F.M., Thorner, J., Nombela, C., Molina, M., and Cid, V. (2005) Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J* **390**: 613–623.
- Roncero, C. (2002) The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* **41**: 367–378.
- Roncero, C., and Sanchez, Y. (2010) Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast* **27**: 521–530.
- Sanchatjate, S., and Schekman, R. (2006) Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol Biol Cell* **17**: 4157–4166.
- Sanz, M., Trilla, J.A., Duran, A., and Roncero, C. (2002) Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Mol Microbiol* **43**: 1183–1195.
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A., and Roncero, C. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology* **150**: 3229–3241.
- Schekman, R., and Brawley, V. (1979) Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 645–649.
- Stimpson, H.E., Toret, C.P., Cheng, A.T., Pauly, B.S., and Drubin, D.G. (2009) Early-arriving Syp1p and Ede1p function in endocytic site placement and formation in budding yeast. *Mol Biol Cell* **20**: 4640–4651.
- Trilla, J.A., Cos, T., Duran, A., and Roncero, C. (1997) Characterisation of *CHS4* (*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**: 795–807.
- Valdez-Taubas, J., and Pelham, H.R. (2003) Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* **13**: 1636–1640.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 10287–10292.
- Valdivia, R.H., Baggot, D., Chuang, J.S., and Schekman, R. (2002) The yeast Clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* **2**: 283–294.
- Versele, M., and Thorner, J. (2005) Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* **15**: 414–424.
- Zanolari, B., Rockenbauch, U., Trautwein, M., Clay, L., Barral, Y., and Spang, A. (2011) Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **124**: 1055–1066.
- Zonia, L., and Munnik, T. (2008) Vesicle trafficking dynamics and visualization of zones of exocytosis and endocytosis in tobacco pollen tubes. *J Exp Bot* **59**: 861–873.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

# Discusión General

---







Las levaduras recapitulan aspectos fundamentales de la célula eucariota, incluyendo procesos tales como la biogénesis y las funciones de los orgánulos celulares, el plegamiento y secreción de proteínas, o la dinámica y regulación del citoesqueleto. La lista de proteínas de *S. cerevisiae* que se ha usado como modelo para estudiar estos procesos es extensa. Entre todas ellas, Chs3 constituye un caso único dada la estrecha regulación a la que se ve sometida a lo largo del ciclo y frente a distintas condiciones que ponen en compromiso la integridad celular.

Esta intrincada regulación requiere de una no menos compleja maquinaria accesoria, cuya función es escoltar a Chs3 a lo largo de toda la ruta de secreción y endocitosis. Su salida del RE requiere de la interacción con Chs7. La exportación desde el TGN es llevada a cabo mediante el exómero, una maquinaria molecular reservada a un número muy reducido de proteínas cargo. Su activación y localización en la MP depende de Chs4, proteína esencial en la regulación de la endocitosis de Chs3. Por último, una vez que Chs3 ha sido endocitada, es reciclada desde el sistema endosomal hacia el TGN en vesículas de clatrina. Aunque muchos de estos factores están bien caracterizados, todavía no se conocen los detalles de cómo consiguen actuar en conjunto para lograr una regulación tan precisa de Chs3. En este trabajo hemos abordado la regulación de Chs3 desde una perspectiva distinta a como se ha realizado hasta ahora. En lugar de centrarnos en los fenotipos que exhiben los mutantes carentes de algunas de las proteínas mencionadas, hemos querido analizar la función aislada de cada una de las regiones de la quitín sintasa. Esta aproximación nos ha desvelado que la estructura y regulación de Chs3 es incluso más compleja de lo que se pensaba, llevándonos a descubrir nuevos aspectos de la regulación de la actividad QSIII.

Hemos analizado también los mecanismos que rigen la localización de Chs3 durante dos estadios diferenciados de la vida de *S. cerevisiae*, el crecimiento vegetativo y la conjugación. Sorprendentemente, el exquisito reciclaje endocítico al que se ve sometido Chs3 durante el crecimiento vegetativo es prescindible durante la conjugación. Este cambio de dinámica obedece a la necesidad de localizar la quitina en regiones muy distintas de la célula en ambas fases de crecimiento.

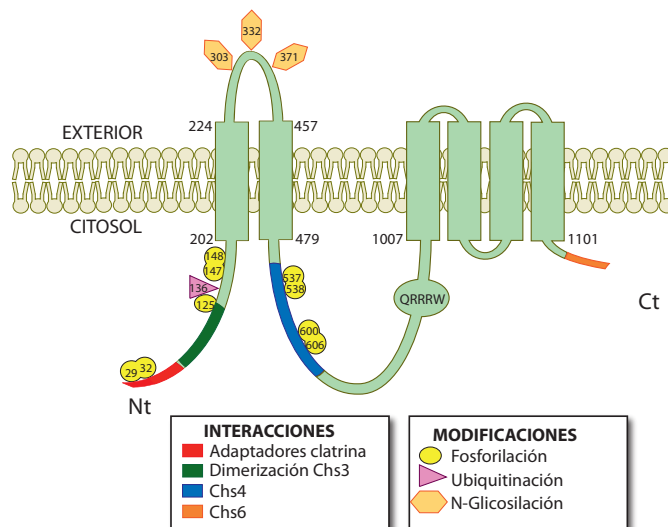
A continuación se discutirán los resultados relacionados con el tráfico intracelular de Chs3 de los tres capítulos de los que consta esta tesis. Pero además, se ha creído conveniente añadir nuevos resultados, no recogidos en los artículos, que aportan detalles adicionales de la función de los dominios N-terminal y C-terminal de Chs3, y que por tanto aportan una visión más integrada de la regulación de Chs3.

## 1. TOPOLOGÍA DE CHS3 (Capítulo 2)

En los últimos 10 años se han hecho importantes avances en la caracterización de la regulación del tráfico intracelular de Chs3. Dada la complejidad de este transporte, el gran número de factores que interaccionan con Chs3, y la naturaleza politópica de esta proteína, se antojaba necesario delinear con mayor exactitud la topología de Chs3 para poder profundizar en los mecanismos de su regulación.

El posicionamiento de las modificaciones postraduccionales de Chs3 sobre el esqueleto de hélices transmembrana predicho informáticamente nos ha permitido delinear una topología de Chs3 más exacta que la última publicada hasta la fecha (Meissner et al., 2010). Nuestra topología consta de seis hélices transmembrana que delimitan tres lazos extracelulares y cuatro regiones citosólicas (**Figura 1**). Tal y como se comentará en los siguientes apartados de esta discusión, el dominio N-terminal, la extensa región globular central, y el dominio C-terminal, todos ellos citosólicos, juegan un papel primordial en la regulación de Chs3.

El extremo N-terminal concentra gran cantidad de modificaciones postraduccionales, que incluyen diversas fosforilaciones (Albuquerque et al., 2008; Li et al., 2007; Smolka et al., 2007; nuestros resultados) y una ubiquitinación en la lisina 136 (Peng et al., 2003). Como parte del trabajo de esta tesis y de estudios pasados en nuestro laboratorio, se ha llevado a cabo la mutación individual o conjunta de todos estos sitios, sin embargo, no se han encontrado fenotipos evidentes, ni en la síntesis de quitina, ni en la distribución intracelular de las proteínas mutadas. Por tanto, el papel que las modificaciones postraduccionales desempeñan en la regulación de Chs3 queda todavía por desvelar. En *Candida albicans*, sin embargo, se ha descrito el papel crítico de una fosforilación en el dominio N-terminal para la correcta localización de CaChs3 en la MP (Lenardon et al., 2010). Es posible que la ausencia de fosforilación en CaChs3 pudiera afectar directamente a la estructura de su dominio N-terminal, lo que afectaría a su dimerización y por tanto a su distribución intracelular.



**Figura 1.** Topología, modificaciones postraduccionales y dominios de interacción de Chs3.

Continuando con nuestro análisis, abordamos también el estudio de la N-glicosilación de Chs3 (Cos et al., 1998). De acuerdo con nuestra topología, solo las glutaminas correspondientes a los residuos 303, 332 y 371, todas ellas localizadas en el primer lazo extracelular, podían ser susceptibles de ser sitios potenciales de N-glicosilación. Un análisis masivo reciente de N-glicosilación en *S. cerevisiae* ha confirmado que el residuo N332 está glicosilado (Breidenbach et al., 2012), sin embargo, nuestros experimentos demostraron que solamente la mutación de los tres residuos conjuntamente conseguía eliminar completamente la N-glicosilación de Chs3, lo que sugiere que las tres glutaminas se encuentran modificadas. Desafortunadamente, la carencia de fenotipos apreciables de estos mutantes no nos ha permitido clarificar la función que la N-glicosilación desempeña en Chs3, algo ya descrito en otras proteínas politópicas como el CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) (Chang et al., 2008).

El siguiente dominio es la región globular central. Ésta ha sido la mejor caracterizada de todas ya que es la que contiene el dominio catalítico de la enzima, representado por la secuencia QRRRW (Cos et al., 1998), y donde trabajo previo en nuestro grupo y en otros laboratorios ha mapeado la región de interacción entre Chs3 y Chs4 (DeMarini et al., 1997; Ono et al., 2000; Meissner et al., 2010).

Por último, Chs3 posee una serie de cuatro hélices transmembrana que desembocan en el extremo C-terminal citosólico. Se ha propuesto que este dominio posee un papel directo en la síntesis de quitina, ya que mutantes de delección del mismo pierden completamente la funcionalidad (Cos et al., 1998).

Poniendo como base la nueva topología y los antecedentes mencionados, pasemos a continuación a discutir las funciones de los tres grandes dominios citosólicos de Chs3.

## 2. PAPEL DEL DOMINIO *CHS* (Capítulo 1)

Nuestra aproximación al estudio de la síntesis de quitina mediante la expresión heteróloga de quimeras del dominio *CHS* no solo nos permitió analizar distintas características de las propiedades biológicas de las QS estudiadas, sino que nos aportó información importante relativa a la estructura y función de este dominio.

Como era lógico esperar, existe una relación directa entre la funcionalidad de las quimeras y el grado de similitud que mostraba la región sustituida con *Chs3*. Pero además, es relevante el hecho de que cuanto más divergente era la región sustituida respecto a *ScCHS3*, mayor fue el incremento sobre la síntesis de quitina que se obtuvo cuando se sobreexpresó *CHS7* (**Capítulo 1, Figura 3**). Esta observación y la retención mostrada por *CnChs3* en el RE nos indica que el dominio globular central tiene una función importante en la salida de *Chs3* del RE. El grado de especificidad en la interacción entre *Chs3* y *Chs7* parece extraordinariamente alto, hasta el punto de que la proteína completa *CaChs3* no es reconocida funcionalmente por *ScChs7* ([Sanz et al., 2005](#); [este trabajo](#)), por lo que si la región sustituida en las quimeras estuviera implicada en dicha interacción, la retención en el RE podría explicarse por un peor reconocimiento por parte de la chaperona. No obstante, parece poco probable que *Chs7* interactúe con *Chs3* por el dominio soluble *CHS*, ya que el mecanismo de acción más aceptado para las chaperonas embebidas en la membrana del RE es que estabilizan a sus proteínas cliente interaccionando con ellas a través de sus segmentos hidrofóbicos ([Shao & Hegde, 2011](#)). Por otra parte, los segmentos transmembranales de las proteínas cargo son un elemento clave para definir si una proteína ha de exportarse o no del RE ([Herzig et al., 2012](#)). Por tanto, es más probable que las alteraciones en el plegamiento de la región *CHS* impongan restricciones en la inclinación o disposición de las hélices que la flanquean dentro de la bicapa lipídica, limitando por tanto la interacción de *Chs3* con los factores de plegamiento y exportación del RE.

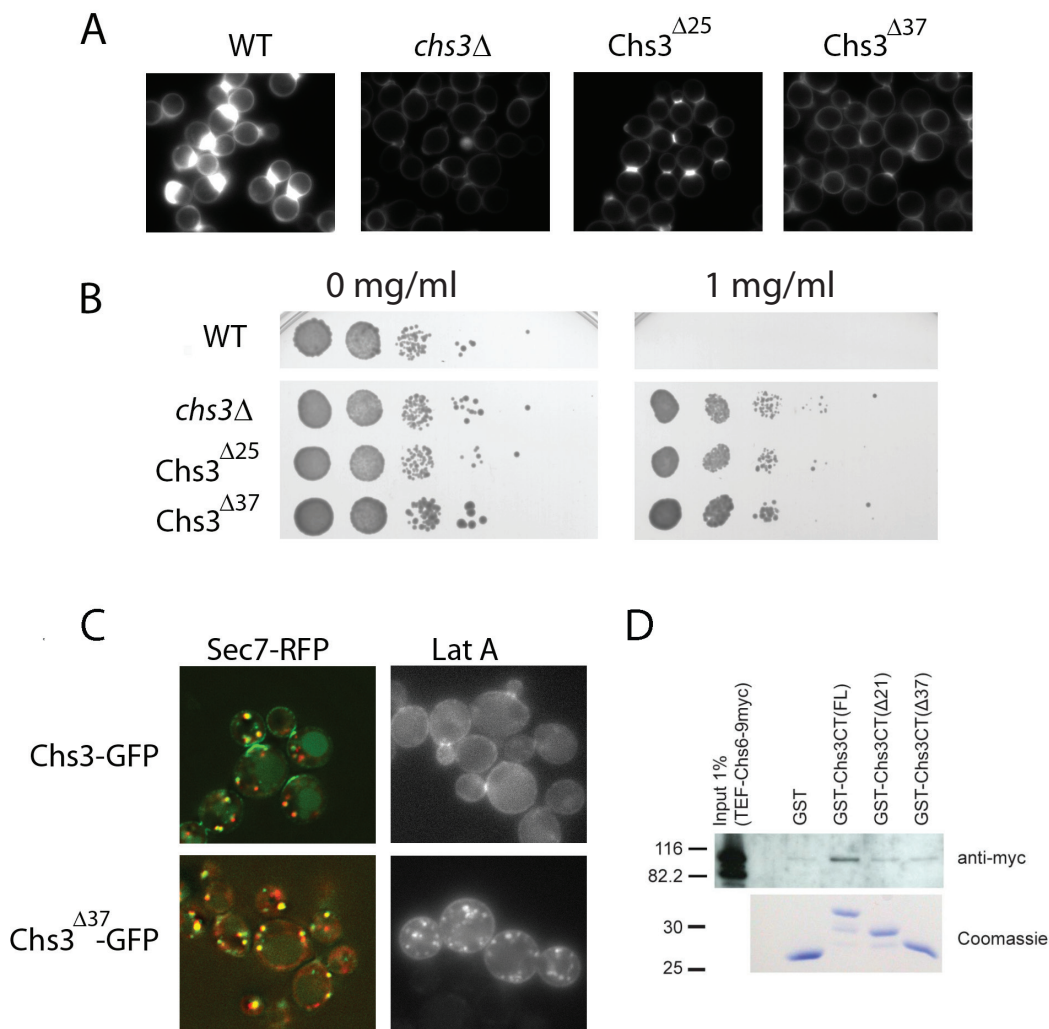
Más sorprendente fue el análisis de la quimera *CaCHS3*, ya que a pesar de poseer una similitud muy elevada con *ScCHS3* en la región sustituida (83,5%), presentó diferencias reseñables en su comportamiento respecto a la proteína silvestre. De manera resumida, *CaChs3* mostró una actividad quitín sintasa basal muy alta, acompañada de una mayor acumulación en la MP. Ambas observaciones apuntan a un defecto en la endocitosis de *CaChs3*. Si bien es cierto que *Chs4* juega un papel clave en el control de la endocitosis de *Chs3* ([Reyes et al., 2007](#)), parece poco probable que la quimera construida muestre una mayor afinidad por *Chs4*, puesto que la supuesta región de interacción de *Chs4* con *Chs3* en ambos organismos es idéntica en secuencia. Otra posibilidad para explicar su elevada actividad basal es que el cambio introducido en el dominio *CHS* permitiera una mayor accesibilidad de la UDP-N-acetilglucosamina al centro catalítico. Sin embargo, los resultados de cinética enzimática tampoco parecen soportar esta hipótesis. Por último, la comparación de la región sustituida muestra que varios de los aminoácidos divergentes entre las dos proteínas son sitios potenciales de fosforilación o ubiquitinación, que pudieran estar regulando el reciclaje endocítico de la proteína. No obstante, dichas modificaciones posttraduccionales no se han encontrado en los múltiples análisis de espectrometría de masas.

Pequeñas alteraciones del dominio *CHS*, por tanto, dan lugar a fenotipos de distinta índole, lo que hace pensar que es un pieza estructural central en la arquitectura de la QSIII. El mecanismo por el que *Chs4* activa a *Chs3* es todavía desconocido, si bien la inducción de un cambio conformacional sobre el centro catalítico de *Chs3* parece la forma de acción más probable. La elevada sensibilidad del dominio *CHS* a pequeñas alteraciones podría ir en línea con estas suposiciones, y que una ligera modificación promovida por la interacción con *Chs4* determinara un cambio más o menos drástico en la conformación global de la enzima que diera paso a su activación.

**3. PAPEL DEL DOMINIO C-TERMINAL**  
**(Rockenbauch et al., 2012, ver Apéndice)**

**Chs3 interactúa con la subunidad Chs6 del exómero por su dominio C-terminal**

Estudios previos en nuestro laboratorio habían demostrado que el dominio C-terminal es esencial para la funcionalidad de la enzima, habiéndosele asignado un papel directo en la actividad catalítica (Cos et al., 1998). No obstante, nunca se había caracterizado el comportamiento intracelular de mutantes afectados en este dominio de Chs3. Con este objetivo construimos dos formas truncadas de Chs3 carentes de los últimos 25 y 37 aminoácidos (Chs3<sup>Δ25</sup> y Chs3<sup>Δ37</sup>) a las cuales les fusionamos una copia de la GFP. El análisis de estos mutantes confirmó que la delección del extremo C-terminal afecta a la funcionalidad de Chs3, mostrando ambas construcciones resistencia a calcoflúor y la ausencia de tinción tras la incubación con este compuesto (**Figura 2A y B**). Dado que el mutante Chs3<sup>Δ37</sup> era el que mostraba los fenotipos más severos, pasamos a centrarnos en la localización intracelular de éste. Menos del 5% de las células mostraban a la forma Chs3<sup>Δ37</sup>-GFP localizada en el cuello, concentrándose ésta en vesículas intracelulares



**Figura 2. Caracterización de las formas de Chs3 truncadas en el extremo C-terminal.** A) Tinción con calcoflúor. B) Resistencia a calcoflúor. C) Localización de la forma truncada Chs3<sup>Δ37</sup>-GFP, usando Sec7-RFP como marcaje del TGN (panel izquierdo) y su localización después del tratamiento con la LatA (panel derecho). D) Ensayos de "pull-down" entre el extremo C-terminal de Chs3 y formas truncadas del mismo marcadas con GST y Chs6-9xMyc.

correspondientes con el TGN (**Figura 2C, panel izquierdo; ver gráfica Figura 5C más adelante**). Esta localización podría explicarse por una deficiencia en el transporte de la forma trunca hacia la MP, similar a lo que ocurre en el mutante *chs5Δ*; o bien por una endocitosis muy rápida que redujera el tiempo de residencia de la misma en el cuello, tal y como ocurre en el mutante *chs4Δ*. Para discernir entre estas dos posibilidades, tratamos las células con la latrunculina A (LatA), un inhibidor de la endocitosis (**Figura 2C, panel derecho**). Comprobamos que aunque parte de la proteína pasaba a residir a la MP, la retención en vesículas intracelulares era todavía mayoritaria, lo que indicaba que la delección del extremo C-terminal inactivaba parcialmente el transporte de Chs3 desde el TGN a la MP.

El exómero es una estructura que actúa en el transporte de Chs3 desde el TGN a la MP. Este complejo está formado por Chs5 y una familia de proteínas denominadas ChAPs (Bch1, Bchs2, Bud7 y Chs6) (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Chs5 es la subunidad que coordina el ensamblaje del complejo, siendo Chs6 la responsable del reconocimiento de Chs3. Por tanto, los fenotipos observados podrían explicarse por una interacción deficiente de Chs3<sup>A37</sup> con Chs6, lo que también explicaría la llegada de Chs3<sup>A37</sup> a la MP en mutantes del complejo AP-1 (no mostrado). Para comprobarlo, llevamos a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra. Spang ensayos de "pull-down" *in vitro* de un fragmento correspondiente a los últimos 55 aminoácidos de Chs3, y una serie de variantes truncadas del mismo (Chs3<sup>A21</sup> y Chs3<sup>A37</sup>). Dichos fragmentos fusionados a GST se expresaron y purificaron en *E. coli*, y posteriormente se inmovilizaron en bolas de glutatión sefarosa. Las proteínas inmovilizadas se incubaron con extractos de levadura que expresaban Chs6-9xMyc, y posteriormente se analizó la unión (**Figura 2D**). Efectivamente, Chs6-9xMyc fue capaz de unirse al fragmento C-terminal completo, pero no a las formas truncadas. Estos resultados sugieren que el extremo C-terminal de Chs3 tiene un sitio de reconocimiento por el exómero que se requiere para la unión de Chs6 *in vitro* y para la exportación desde el TGN *in vivo*.

Fus1 es otro cargo que requiere el exómero para alcanzar la MP, en este caso durante conjugación (Santos & Snyder, 2003). Fus1 es reconocido por las ChAPs Bch1 y Bud7. El motivo de reconocimiento también reside en la cola C-terminal de la proteína y se asignó específicamente a la secuencia IXTPK (Barfield et al., 2009). No obstante, este motivo está ausente del extremo C-terminal de Chs3, y no existe homología alguna entre las colas de las dos proteínas. Por otra parte, la fusión de la cola C-terminal de Fus1 y Chs3 a Kex2, una proteína residente en el TGN, no es suficiente para promover la exportación de las proteínas quiméricas a la MP de forma dependiente del exómero (Barfield et al., 2009; Rockenbauch et al., 2012). En conjunto, estas observaciones sugieren que el reconocimiento entre las ChAPs y sus cargos es compleja, y no es dependiente de una secuencia lineal única sino del contexto global de la proteína (Barfield et al., 2009; Rockenbauch et al., 2012).

### **El extremo C-terminal de Chs3 está implicado directamente en la síntesis de quitina**

Ya que la inhibición de la endocitosis permite retener una fracción significativa de Chs3<sup>A37</sup> en la MP (**Figura 2C**), tratamos las células con la LatA para a continuación proceder a incubarlas con calcoflúor, sin embargo no detectamos un incremento en la síntesis de quitina respecto al control sin LatA (no mostrado). Este resultado sugiere que el extremo C-terminal no solo se requiere para el transporte de Chs3 sino que también participa en la actividad enzimática de la proteína. Es posible que este dominio contribuya a la conformación del bolsillo catalítico de la enzima situado en la región globular central, o que sea parte esencial en la formación del poro de membrana a través del cual se extruyen las cadenas lineales de quitina, como ya se ha propuesto con anterioridad (Merzendorfer, 2011).

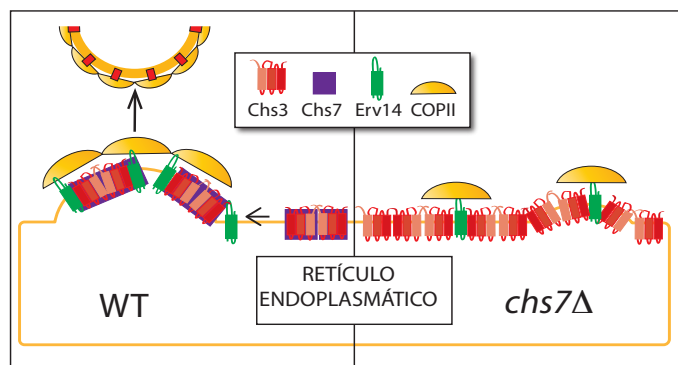
#### 4. PAPEL DEL DOMINIO N-TERMINAL (Capítulo 2 y Resultados no recogidos en los artículos)

La dimerización mediada por el dominio N-terminal de Chs3 juega un papel clave en la regulación de la proteína. Los esfuerzos de la célula para evitar que monómeros de Chs3 se expresen en la superficie celular resaltan la importancia que tiene la estructura cuaternaria de la QSIII para el ensamblaje de una quitina correcta. Pero además, el dominio N-terminal tiene una función importante en la distribución de Chs3 en el TGN y en la regulación de su endocitosis. Analicemos a continuación ordenadamente cada uno de estos pasos de la ruta de secreción.

##### Salida de Chs3 del RE (Capítulo 2)

El análisis de la retención observada en el RE de las formas truncadas en el extremo N-terminal de Chs3 nos permitió identificar a Erv14 como el receptor que media la salida de Chs3 del RE. De esta manera, Chs3 se añade a la lista de proteínas que confirman a Erv14 como el principal receptor de proteínas transmembranales en el RE (Herzig et al., 2012). Se ha propuesto que la interacción entre Erv14 y sus proteínas cargo tiene lugar a través de las hélices transmembrana (Herzig et al., 2012). En concordancia con estas observaciones, <sup>Δ126</sup>Chs3 no tenía afectada la interacción con Erv14 (Capítulo 2, Figura 2D), y por tanto, presumiblemente es capaz de abandonar el RE sin problemas.

Sorprendentemente, la delección de *CHS7* tampoco afectó a la interacción de Chs3 con Erv14. La función de Chs7 y otras chaperonas específicas de sustrato ha sido debatida con anterioridad (Dancourt & Barlowe, 2010; Kota & Ljungdahl, 2005). De entre este grupo de chaperonas, Shr3 es la mejor estudiada y se ha demostrado que interacciona con componentes de la cubierta COPII (Gilstring et al., 1999) y que asiste el plegamiento de la permeasa de aminoácidos Gap1 (Kota & Ljungdahl, 2005). En base a estas observaciones, se ha propuesto que Shr3 participa como una chaperona que facilita el empaquetamiento de las permeasas de aminoácidos en vesículas COPII. El hecho de que Erv14 interactione correctamente con Chs3 en ausencia de Chs7 sugiere que en estas condiciones Chs3 no tiene restricciones para interactuar con la cubierta COPII. ¿Cómo se explica entonces que Chs3 no salga del RE en ausencia de Chs7? Es posible que los agregados que se inducen en el mutante *chs7Δ* sean tan voluminosos que superen la capacidad de carga de las vesículas COPII. De ser así, la función de Chs7 pudiera ser impedir la formación de estos acúmulos favoreciendo la incorporación de Chs3 en paquetes adecuadas a la capacidad de la vesícula (Figura 3). Este modelo explicaría también el hecho de que Gap1 no parece tener afectada su inserción en la MP cuando Shr3 no está presente y de hecho, cuando se inhibe su degradación por ERAD, una pequeña fracción de la proteína es capaz de alcanzar la MP en una conformación activa (Kota et al., 2007). Hemos visto que Chs3 dimeriza y seguramente tiene potencial para formar complejos más grandes. Es por tanto tentativo pensar que este grupo de proteínas que requieren chaperonas específicas, además de presentar una topología polipéptica, también compartan la necesidad de funcionar en la MP en forma de oligómeros.

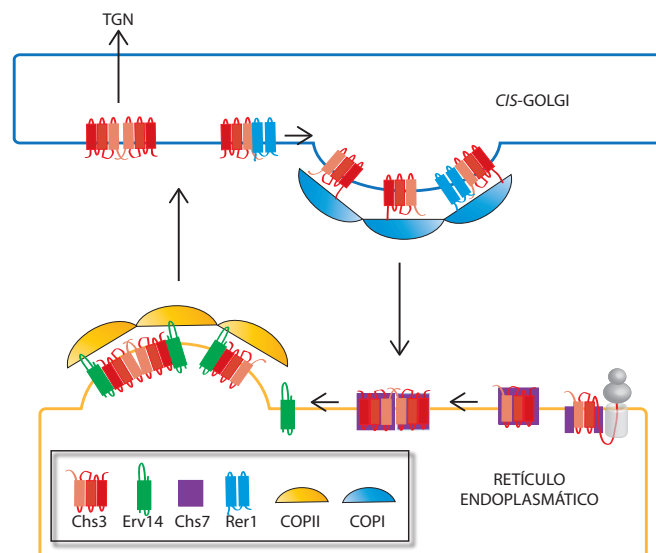


**Figura 3. Modelo hipotético de acción de Chs7.** Es posible que los dímeros de Chs3 tiendan a agregarse en complejos mas grandes en la MP, de manera que Chs7 pudiera actuar en el RE segregando unos dímeros de otros, favoreciendo su empaquetamiento en vesículas COPII (izquierda). En ausencia de *CHS7*, Chs3 formaría los supracomplejos prematuramente en el RE desbordando la capacidad de carga de las vesículas COPII (derecha).

## Aparato de Golgi I: Retorno de monómeros de Chs3 al RE (Capítulo 2)

Nuestros resultados sugieren que los monómeros de Chs3 exponen al menos dos señales distintas de retorno. Por una parte, la cubierta COPI secuestra a Chs3 por un motivo canónico dilisina situado en el extremo C-terminal de la proteína, mientras que la segunda señal parece dependiente del receptor Rer1. El grupo del Dr. Nakano describió que Rer1 también participa en la recuperación desde el Golgi de la subunidad del complejo transportador de hierro Fet3 cuando no se ensambla correctamente con su subunidad complementaria Ftr1 en el RE (Sato et al., 2004), de tal manera que Rer1 reconoce residuos polares flanqueantes en las hélices transmembrana de sus ligandos (Sato et al., 2003). En analogía con este ejemplo, es posible que el dímero de Chs3 proteja bajo su estructura una hélice transmembrana que solamente quede expuesta al reconocimiento por Rer1 cuando el dímero no se ensambla adecuadamente, siendo el mismo mecanismo aplicable para la ocultación del motivo dilisina del extremo C-terminal (Figura 4). Aunque todavía no se ha abordado con demasiado detalle el mecanismo de acción de Rer1, se ha propuesto que esta proteína, al poseer sus propias señales de vuelta al RE, actúa como un adaptador entre las proteínas cargos y la cubierta COPI (Sato et al., 2001). De ser así, la delección de *RER1* debería ser suficiente para liberar completamente a Chs3 del RE, sin embargo, el motivo dilisina parece ser la principal señal de retorno ya que su eliminación resultó la forma más efectiva para rescatar a  $\Delta^{126}$ Chs3 del RE (Material Suplementario del Capítulo 2, Figura S3, página 138). Por tanto, es posible que la función de Rer1 sea incrementar la eficiencia del proceso. De esta manera, podría actuar como un factor de retención o chaperona que mediara la concentración de los monómeros para favorecer el ensamblaje de la cubierta sobre las propias señales de Chs3.

Por último, cabe reseñar que la eliminación del mecanismo de retorno hacia el RE no supone un aumento significativo de la cantidad de  $\Delta^{126}$ Chs3 que encontramos en la MP, sino un incremento de la señal en vacuola. Este hecho implica que las subunidades de Chs3 mal ensambladas son sustrato de un segundo sistema de control en la ruta de secreción tardía. Por tanto, múltiples sistemas de control a lo largo de la ruta de secreción podrían monitorizar el estado de plegamiento para prevenir efectos tóxicos causados por la acumulación de proteínas mal plegadas.

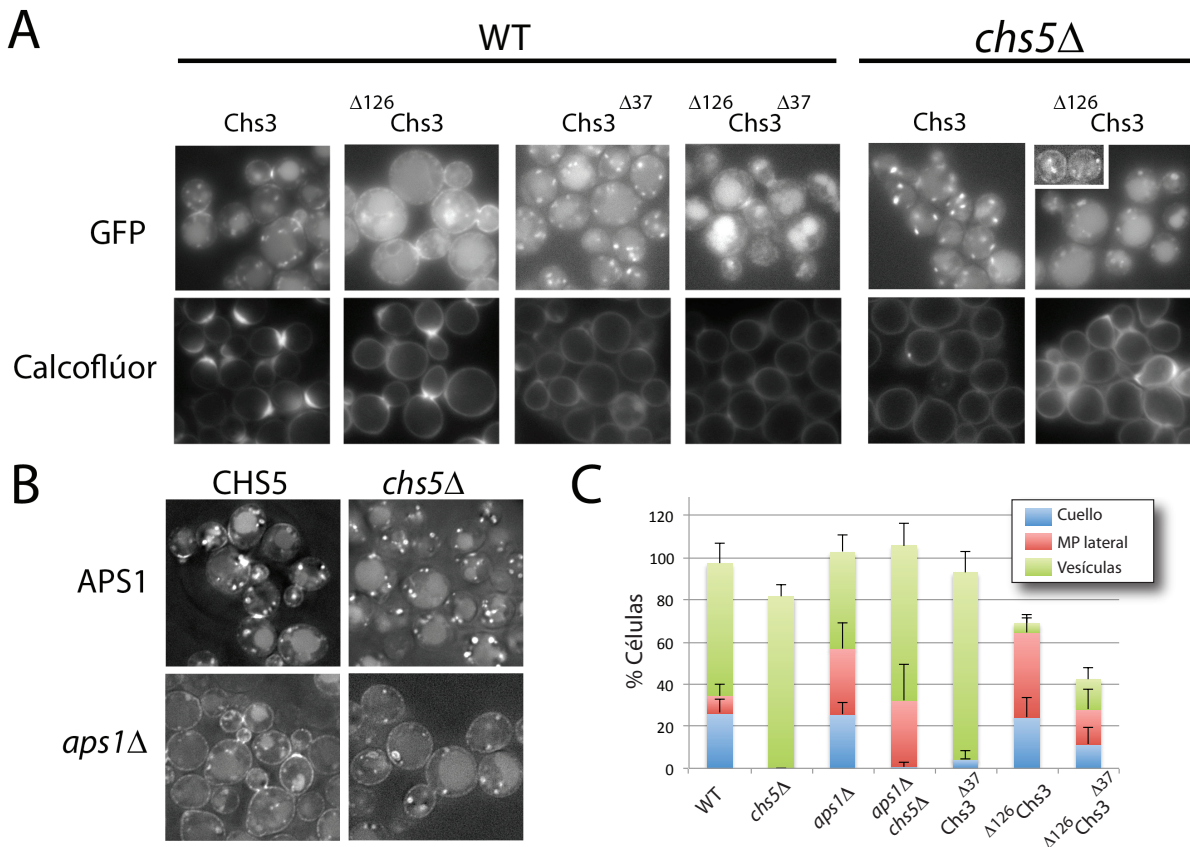


**Figura 4. Modelo del control de la dimerización de Chs3 en el aparato de Golgi.** Chs3 dimeriza en el RE y se empaqueta en vesículas COPII con ayuda del adaptador Erv14. Las moléculas de Chs3 que alcanzan el aparato de Golgi en forma de monómeros, son retenidas por Rer1 y devueltas al RE en vesículas COPI que reconocen un motivo dilisina situado en el dominio C-terminal de Chs3.

**Aparato de Golgi II: Deficiencia en la interacción con cubiertas de clatrina  
(Resultados no recogidos en los artículos)**

Una observación llamativa fueron los fenotipos opuestos que mostraban las formas truncadas de ambos extremos terminales. Si bien la delección del N-terminal de Chs3, acompañada de la sobreexpresión de *CHS7*, daba lugar a la redistribución de  $\Delta^{126}$ Chs3 por toda la MP, y práctica ausencia de vesículas intracelulares;  $\text{Chs3}^{\Delta 37}$  representaba justo la situación contraria, viéndose retenida casi completamente en el TGN. Por ello, nos preguntamos cual sería la localización de la forma de Chs3 carente de los dos extremos terminales. Así, construimos el mutante doble  $\Delta^{126}\text{Chs3}^{\Delta 37}$ -GFP y analizamos su localización (**Figura 5A y 5C**). Sorprendentemente, la población de este mutante mostraba un menor porcentaje de células con vesículas intracelulares respecto a la forma truncada en el C-terminal, acompañado de un incremento de la proteína en la MP y en la vacuola.

Por tanto, la delección del N-terminal parecía permitir circunvalar la retención en el TGN mediante una ruta alternativa hacia la MP. Para comprobarlo, expresamos  $\Delta^{126}$ Chs3-GFP en el mutante del exómero *chs5* $\Delta$ . La forma truncada mostró una menor retención en vesículas intracelulares que la proteína Chs3 silvestre en *chs5* $\Delta$  (**Figura 5A y 5C**), y aunque la llegada a la MP no era evidente, pudimos detectar deposición de quitina mediante tinción con calcoflúor (**Figura 5A, paneles inferiores**). No obstante, nos llamó la atención que el calcoflúor tiñera homogéneamente toda la PC y no los cuellos. Este efecto podría achacarse al efecto sinérgico de



**Figura 5. Análisis de la localización de Chs3 en distintos mutantes y de las formas truncadas de Chs3.** A) Localización de las formas truncadas de Chs3 marcadas con GFP (paneles superiores) y tinción con calcoflúor (paneles inferiores). B) Localización de Chs3-GFP en los mutantes indicados. Obsérvese la localización de Chs3 tanto en cuellos como en la MP lateral en el mutante *aps1* $\Delta$ , pero solo en la MP lateral en el mutante *chs5* $\Delta$ *aps1* $\Delta$ . C) Gráfica del porcentaje de células que muestran a Chs3 localizada en el cuello (azul), deslocalizada en la MP lateral (rojo) o retenida en vesículas (verde).

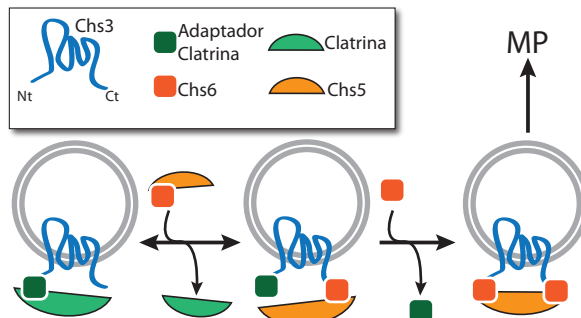


la menor tasa de transporte de la ruta alternativa acompañada de la deficiente tasa endocítica que presenta <sup>A126</sup>Chs3; o a que la ruta alternativa no estuviera polarizada, lo cual sería un prueba indirecta de que el exómero permite el transporte vectorial de proteínas hacia el cuello, un modelo que se ha propuesto con anterioridad pero que nunca se ha podido comprobar experimentalmente (Trautwein et al., 2006).

Distintos trabajos han demostrado que la retención de Chs3 en el sistema TGN/endosomas es dependiente de cubiertas de clatrina, de tal manera que la disrupción de su ensamblaje abre una ruta alternativa para Chs3 en dirección a la MP independiente del exómero (Copic et al., 2007; Liu et al., 2008; Trautwein et al., 2006; Valdivia et al., 2002), justo el proceso que recapitula la delección del extremo N-terminal. Por tanto, pasamos a comprobar si Chs3 era transportada de manera no polarizada en un mutante que tuviera afectada la retención en el TGN (*chs5Δ*) y abierta la ruta alternativa (mutante *aps1Δ* del complejo adaptador de clatrina AP-1). Efectivamente, Chs3-GFP fue capaz de alcanzar la MP en el mutante doble *chs5Δaps1Δ* (**Figura 5B**), pero apenas observamos células con señal en el cuello, apareciendo mayoritariamente deslocalizada por la MP lateral (**Figura 5B y 5C**). En contraposición, el mutante simple *aps1Δ* presentaba a Chs3 tanto en el cuello como dispersa por la MP lateral (**Figura 5B y 5C**), lo que sugeriría nuevamente que el exómero es un mecanismo de polarización de Chs3. El hecho de que el mutante *aps1Δ* además mostrara vesículas intracelulares conteniendo a Chs3 es un indicativo de que la deslocalización por la MP no se debía a una menor endocitosis de la proteína, sino a un transporte no polarizado dirigido hacia la MP lateral. Por último, quedaba por comprobar si efectivamente el mutante carente del extremo N-terminal accedía a la ruta alternativa debido a una deficiente interacción con adaptadores de clatrina. El laboratorio del Dr. Schekman demostró que los adaptadores AP-1 y Ent5 son responsables de la incorporación de Chs3 en vesículas de clatrina (Copic et al., 2007; Valdivia et al., 2002). Así, como primera aproximación realizamos una búsqueda predictiva con el programa PIPE-sites (<http://cgmlab.carleton.ca/PIPE-Sites/>) de las regiones de Chs3 que pudieran estar interaccionando con estos adaptadores. El programa predice dos regiones de interacción del dominio N-terminal de Chs3 situadas entre los aminoácidos 42 a 70 y del 120 a 150. Por otra parte, en concordancia con nuestros resultados, el programa también predice que la región C-terminal está implicada en la interacción con Chs6. Dado que el programa apoyaba nuestras observaciones, continuamos llevando a cabo estudios de dos híbridos enfrentando los primeros 126 aminoácidos de Chs3 a Aps1 y Ent5, resultando el ensayo positivo para la interacción con Ent5, pero no con Aps1 (no mostrado).

Durante la escritura de esta tesis, un trabajo del laboratorio del Dr. Schekman ha confirmado nuestras evidencias de que el extremo N-terminal de Chs3 media la interacción con el complejo AP-1 a través de la secuencia DEESLL, situada entre los aminoácidos 17 a 25 de Chs3 (Starr et al., 2012). Además, también muestran mediante “pull-downs” que el extremo N-terminal puede interaccionar con el exómero a través de los residuos D19 y E21, sin embargo, sus resultados no demuestran directamente que estos residuos promuevan la salida de Chs3 del TGN. No obstante, es muy interesante la posibilidad de que Chs3 pudiera interaccionar con el exómero por dos regiones muy distintas de la proteína (el extremo N-terminal y el C-terminal), y que además una de ellas (el extremo N-terminal), también mediase la interacción con los adaptadores de clatrina. En conjunto, todos estos resultados apuntarían a que existe una cooperación íntima entre la cubierta de clatrina y el exómero, y que implicaría que el desensamblaje de la cubierta de clatrina tendría que estar coordinada con el reclutamiento del exómero para evitar la incorporación de Chs3 en una ruta de transporte no fisiológica. Un modelo muy atractivo sería que cuando Chs3 se encuentra retenida en el sistema de endosomas/TGN, el extremo C-terminal se mantendría libre de cualquier unión, mientras que el extremo N-terminal coordinaría la unión de la cubierta de clatrina. En un momento dado, el extremo C-terminal podría nuclear al exómero, lo cual determinaría el desplazamiento de la clatrina. Curiosamente, se ha podido co-inmunoprecipitar al exómero con el complejo AP-1, sin embargo no se ha detectado la presencia de clatrina en dichos complejos (Sanchatjate & Schekman, 2006), además, ambas cubiertas son efectoras

de Arf1 (Trautwein et al., 2006; Valdivia et al., 2002). Estas observaciones serían compatibles con el establecimiento de un equilibrio en el cual el ensamblaje inicial del exómero fuera acompañado del desprendimiento de la clatrina, pero no de sus adaptadores, de tal manera que la vesícula podría evolucionar en cualquiera de las dos direcciones. Si el exómero finalmente no se ensamblara, los adaptadores de clatrina podrían rápidamente reclutar la cubierta de clatrina, previniendo el acceso de Chs3 a la ruta alternativa. Una vez superado este punto de equilibrio, el exómero finalmente desplazaría a los adaptadores situados en el extremo N-terminal, favoreciéndose el ensamblaje completo del exómero y por tanto la salida de Chs3 de manera polarizada (Figura 6).



**Figura 6. Modelo tentativo del reclutamiento de los adaptadores de clatrina y del exómero sobre Chs3.** Chs3 está secuestrada en el sistema TGN/endosomas gracias a la cubierta de clatrina. El reclutamiento inicial del exómero sobre el extremo C-terminal de Chs3 determinaría el desensamblaje de la cubierta de clatrina, pero no de sus adaptadores, que compiten con el exómero por el extremo N-terminal de Chs3. Finalmente, el ensamblaje completo del exómero provocaría el desplazamiento de los adaptadores, y la salida de Chs3 de forma polarizada hacia el cuello de la célula.

### Membrana plasmática: Endocitosis deficiente de $\Delta^{126}$ Chs3 (Capítulo 2)

La ausencia de vesículas intracelulares conteniendo a  $\Delta^{126}$ Chs3 (Figura 5C), y su deslocalización por la MP lateral independientemente de Chs4 (Capítulo 2, Figura 6C) es un fenotipo característico de una endocitosis deficiente de Chs3 (Reyes et al., 2007). La eliminación de los sitios de fosforilación y ubiquitinación presentes en el dominio deleciónado no es la causa de la menor tasa endocítica, ya que mutantes de estos sitios no muestran claramente una menor internalización. Ya que  $\Delta^{126}$ Chs3 parece tener problemas para interactuar con la cubierta de clatrina en el sistema de endosomas, es probable que esta misma deficiencia sea la causante del fenotipo de endocitosis en la MP. Además, la llegada de  $\Delta^{126}$ Chs3 a la MP a través de la ruta no polarizada podría también favorecer su "escapatoria" de la maquinaria endocítica concentrada en la región del cuello, contribuyendo a su menor endocitosis.

La cepa que expresa  $\Delta^{126}$ Chs3, a pesar de tener niveles de quitina normales, exhibe una mayor resistencia a calcoflúor que la cepa silvestre (Capítulo 2, Figura 1B y 1C). Mutantes que poseen la quitina deslocalizada, como es *bni4Δ*, también exhiben una mayor resistencia a calcoflúor (Sanz et al., 2004), sin embargo con mucha menor intensidad. Como se discutirá a continuación, alteraciones adicionales en la síntesis de quitina podrían explicar la relativa resistencia de  $\Delta^{126}$ Chs3 al calcoflúor.

### Papel de la dimerización de Chs3 en la correcta cristalización de la quitina (Capítulo 2)

Chs3 y la celulosa sintasa comparten la capacidad para oligomerizar. Se ha propuesto que la unidad estructural básica de la celulosa sintasa también es la formación de dímeros (tanto homodímeros como heterodímeros), que posteriormente se ensamblan en supraestructuras hexagonales denominadas rosetas (Mutwil et al., 2008; Somerville, 2006). Aunque defendemos que el dímero es la subunidad básica en la que se agrega Chs3, no descartamos en analogía con el ejemplo de la celulosa sintasa, que la QSIII tenga la capacidad para formar complejos más grandes una vez que llega a la MP.

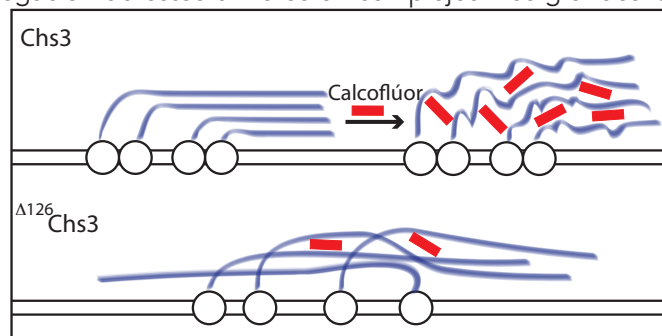
Quitina y celulosa son polímeros que comparten características estructurales, de manera que ambos compuestos son insolubles y altamente resistentes, dos aspectos esenciales para ga-

rantizar la integridad de la PC. Estas propiedades se consiguen gracias a la formación de fibras mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno entre cadenas de polímero enfrentadas antiparalelamente. Dadas estas particulares, no es sorprendente que las maquinarias responsables de la síntesis de ambos compuestos también compartan la capacidad de formar oligómeros. Veamos porqué.

Por una parte, estas enzimas deben ser capaces de formar poros en la MP a través de los cuales se extruyan las fibras de polímero que están siendo sintetizadas en el citoplasma. La disposición ordenada de unos poros respecto a otros favorecería la salida paralela de las fibras, y por tanto, el establecimiento de los enlaces. Diferentes modelos estructurales apuntan que la cantidad de fragmentos transmembrana de los que constan las quitín sintasas o celulosas sintasas son insuficientes para formar un poro completo, siendo necesarios dos o más monómeros para constituirlo. La oligomerización, además, podría solucionar un problema estérico que plantea la síntesis de esta clase de polímeros. Los enlaces  $\beta(1-4)$  implican que cada monómero de azúcar incorporado ha de invertirse  $180^\circ$  respecto al anterior, lo que requeriría un giro de  $180^\circ$  de la cadena aceptora en cada nuevo enlace, o bien una alternancia de conformaciones en el sitio catalítico de la enzima. Este impedimento podría solucionarse fácilmente con la presencia de dos centros activos, uno que formase disacáridos y el otro que incorporase estos disacáridos de modo iterativo sobre la cadena naciente. En este caso, cada dímero formaría una única cadena polisacáridica, siendo la ulterior agregación de estos dímeros en complejos más grandes la que permitiese la cristalización de las fibras (Carpita, 2011).

¿Cómo se adapta Chs3 a los modelos anteriores? El hecho de que  $\Delta^{126}$ Chs3 sea capaz de promover niveles de quitina normales y que presente una actividad catalítica total similar a la proteína silvestre, indica que el monómero de Chs3 tiene la capacidad de procesar una cadena de residuos de N-acetilglucosamina por sí mismo y, por tanto, sería capaz de formar un poro completo. Sorprendentemente, los niveles de quitina sintetizados por la cepa que expresa  $\Delta^{126}$ Chs3 no van

acompañados de la sensibilidad esperada a calcoflúor. Esta paradoja puede explicarse por una menor afinidad del calcoflúor por la quitina sintetizada por  $\Delta^{126}$ Chs3. El modelo propuesto para explicar la acción nociva del calcoflúor es que este compuesto se intercala entre las cadenas nacientes de quitina impidiendo su cristalización, lo que conlleva un aumento de la tasa de síntesis de quitina que finalmente desencadena la muerte celular. La incapacidad de  $\Delta^{126}$ Chs3 para dimerizar probablemente promueva una disposición caótica de los poros en la superficie celular. Las cadenas nacientes de estos poros, por tanto, no podrán cristalizar adecuadamente lo que determinará una menor capacidad del calcoflúor para intercalarse entre las fibras de quitina, explicando el fenotipo observado en relación con la resistencia a calcoflúor (Figura 7). Además, dicha disminución en la cristalización del polímero podría participar en el incremento de la actividad QSIII detectada, al no constituir un impedimento estérico en la polimerización de las cadenas, tal y como se ha descrito con anterioridad (Roncero & Duran, 1985).



**Figura 7. Modelo de acción del calcoflúor.** La capacidad de Chs3 para oligomerizar permitiría la formación de poros paralelos en la MP que favorecerían el empaquetamiento de la quitina. El calcoflúor se intercalaría entre las cadenas de polímero dificultando la cristalización de la quitina.  $\Delta^{126}$ Chs3, al ser incapaz de formar dímeros, daría lugar a fibras de quitina desorganizadas, por las que el calcoflúor mostraría menor afinidad.

## 5. LA COMPARTIMENTALIZACIÓN DEL CUELLO DISTINGUE EL COMPORTAMIENTO DE CHS3 DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO Y LA CONJUGACIÓN (Capítulo 3)

El establecimiento de la polaridad celular dirige procesos tan importantes como la división celular, la organogénesis o la migración celular. A pesar de esta variedad de funciones, los mecanismos moleculares empleados para establecer y mantener la polaridad están conservados a lo largo de la evolución. En *S. cerevisiae* el establecimiento de la polaridad es necesaria en dos procesos vitales, va a guiar la gemación de la célula hija en la división celular, y durante la conjugación va a dar lugar a la formación del *shmoo*.

Son muchas las proteínas que se han estudiado como modelo de polarización durante el crecimiento vegetativo o la conjugación, no obstante no existen estudios comparativos del cambio de regulación en el tráfico intracelular que se produce en la transición de un tipo de crecimiento al otro. Chs3 presenta una distribución polarizada en ambas situaciones, sin embargo, su localización es mucho más restringida durante la división celular que durante el crecimiento hiperpolarizado de conjugación, lo que sugiere que la polarización de Chs3 está gobernada por distintos mecanismos durante ambas fases.

### La compartimentalización en el cuello como mecanismo para regular el reciclaje endocítico de Chs3

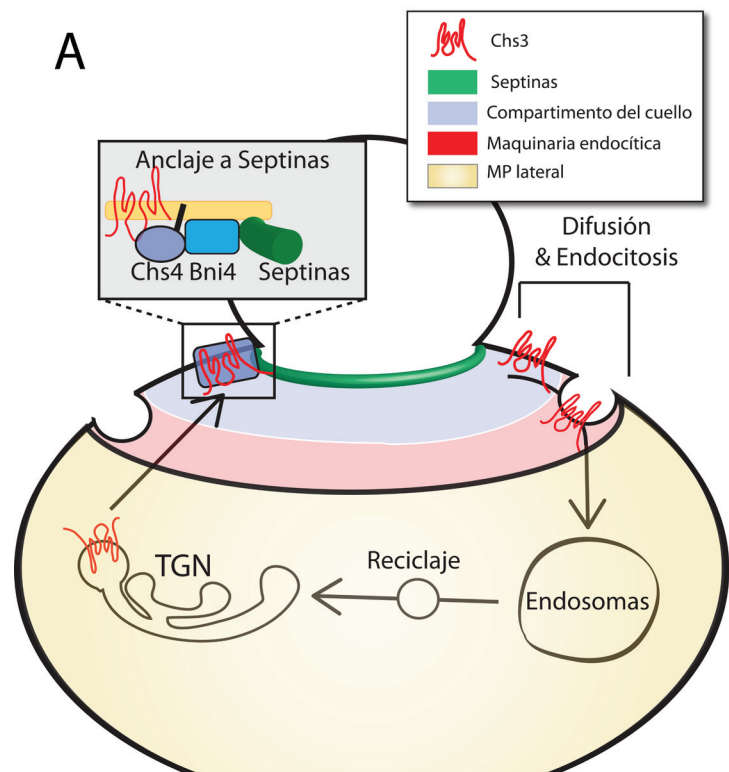
La polarización de Chs3 durante el crecimiento vegetativo depende de dos fenómenos en perfecto equilibrio: de un transporte específicamente dirigido a la región del cuello, y de una endocitosis activa que contrarresta la acumulación promovida por el transporte anterógrado (Reyes et al., 2007). Para que este equilibrio sea posible, Chs3 necesita anclarse físicamente al anillo de septinas, jugando Chs4 un papel clave en este punto (DeMarini et al., 1997), de manera que en ausencia de Chs4, Chs3 es endocitada rápidamente (Reyes et al., 2007). A pesar de conocerse los factores implicados en la correcta localización de Chs3, se desconocía la base molecular que permite el acoplamiento funcional entre el anclaje a las septinas y la endocitosis. Nuestro trabajo revela que el posicionamiento específico de los parches de endocitosis alrededor de las septinas permite delimitar un compartimento de membrana en el cual va a residir Chs3 (Figura 8A). El transporte polarizado de Chs3 hacia esta región va a determinar que se pueda anclar al anillo de septinas, lo que va a permitir su concentración en el cuello. Eventualmente, por ejemplo ante la llegada de nuevas moléculas de Chs3, la proteína se liberará de su anclaje y podrá difundir por la membrana, sin embargo, su movimiento quedará restringido al compartimento definido en el cuello ya que el anillo externo de parches de endocitosis impedirá su difusión hacia la MP lateral. En el mutante *chs4Δ*, Chs3 apenas aparece localizada en el cuello debido a que no puede anclarse al anillo de septinas y, por tanto, queda expuesta inmediatamente a ser endocitada.

Es previsible que en el compartimento del cuello residan todas las proteínas de membrana que se localizan polarizadamente, como así lo indica el hecho de que la v-SNARE Snc1 también esté confinada en la parte interior del anillo de parches de actina (no mostrado), lo que explica su polarización dependiente de endocitosis (Valdez-Taubas & Pelham, 2003). Aunque no hemos abordado la situación de otras proteínas de membrana polarizadas, dos estudios recientes demuestran matemática y experimentalmente que la polarización de Cdc42 también depende de un reciclaje endocítico muy activo, y postulan un papel esencial de las septinas como andamiaje para favorecer su concentración (Layton et al., 2011; Orlando et al., 2011). Estas observaciones serían coherentes con una distribución del regulador de la polaridad celular en el compartimento que aquí describimos, al menos durante el intervalo de tiempo en el que Cdc42 se localiza en el cuello de la yema naciente. El anillo endocítico, además, no solo previene la salida de Chs3 o Snc1 fuera del dominio del cuello, sino que también impide la invasión del mismo por las proteínas residentes de la MP lateral (es decir, todas aquellas proteínas uniformemente distribuidas

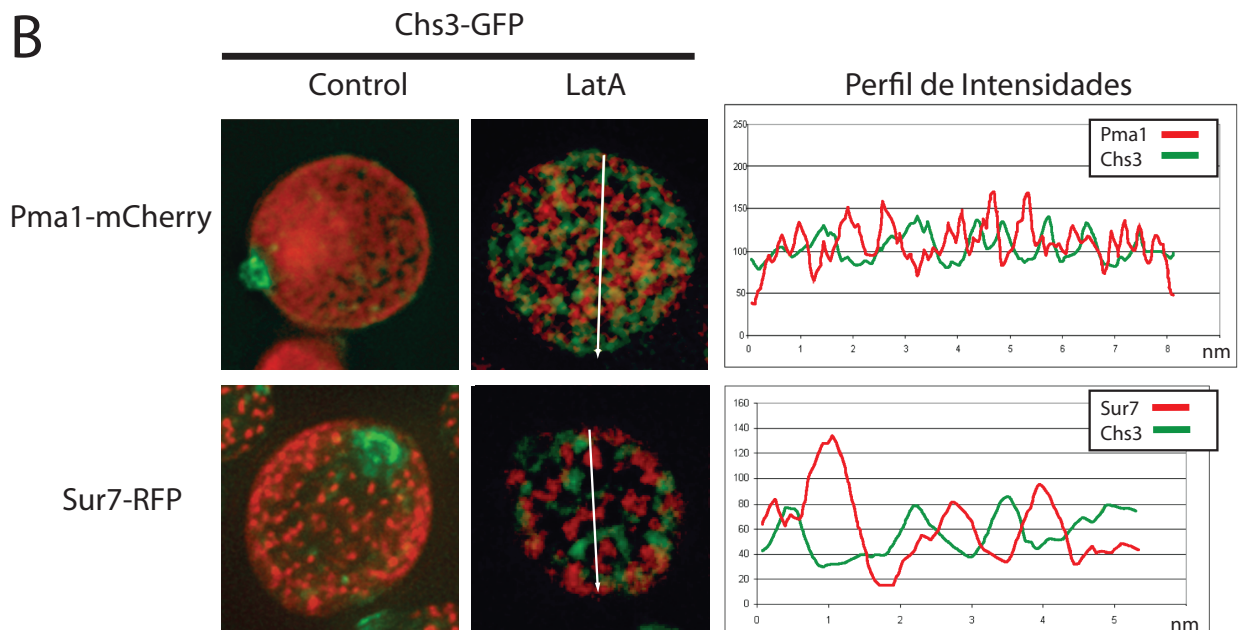
por la MP) como Pma1 y Sur7 (**Figura 8A y 8B**). Hasta ahora se había señalado al anillo de septinas como la barrera física que impedía la difusión de proteínas de membrana desde la célula hija a la célula madre ([Mostowy & Cossart, 2012](#)), no obstante, en nuestro modelo esta barrera la constituyen no solo las septinas sino también la zona de exclusión que delimita el anillo de endocitosis ensamblado en torno a ellas. El modelo plantea la cuestión de cómo la endocitosis es capaz de delimitar este compartimento. Es posible que los parches de actina constituyan un sumidero anular tanto para las proteínas que se localizan en la parte interior del anillo como para aquellas proteínas distribuidas en la MP lateral. Este mecanismo podría explicar la exclusión de aquellas proteínas que están sometidas a una regulación por endocitosis, como Pma1, pero no sería válido para Sur7, una proteína que forma parte de los eisomas donde la endocitosis está

**Figura 8. Compartimento del cuello.**

A) Modelo de la formación de un compartimento de membrana en el cuello. Cuando Chs3 se libera del anillo de septinas puede difundir por la región de membrana delimitada entre las septinas y la zona de endocitosis. El anillo de parches de actina delimita una barrera que impide la difusión de Chs3 fuera del compartimento del cuello, así como la entrada en el mismo de las proteínas distribuidas por la MP lateral. B) Análisis de la co-localización de Chs3-GFP con Pma1-mCherry y Sur7-RFP antes y después del tratamiento con la LatA. En las gráficas se representa la intensidad en unidades arbitrarias del canal verde y rojo (eje de ordenadas) a lo largo de la línea marcada (eje de abscisas). Chs3 se encuentra excluida del compartimento de membrana constituido por Pma1 (MCP) y del compartimento de membrana de Sur7 (MCC), tanto cuando se encuentra polarizada en el cuello como cuando se deslocaliza hacia la MP lateral después de inhibir la endocitosis



**B**



excluida (Brach et al., 2011). Alternativamente, es posible que la peculiar dinámica de transporte y endocitosis característica de la región del cuello determine la concentración de determinados lípidos en torno a esta región, los cuales no sirvan como sustrato para el reclutamiento de las proteínas que actúan como andamiaje en el proceso de ensamblaje de los eisosomas (Moreira et al.; Olivera-Couto et al., 2011). Este segundo modelo explicaría que cuando deslocalizamos a Chs3 del cuello mediante el tratamiento con la LatA tampoco observamos solapamiento con Pma1 y Sur7 en planos de la superficie celular, lo que podría ser un indicio de que el compartimento del cuello es un dominio de membrana distinto del grueso de la MP lateral (Figura 8B).

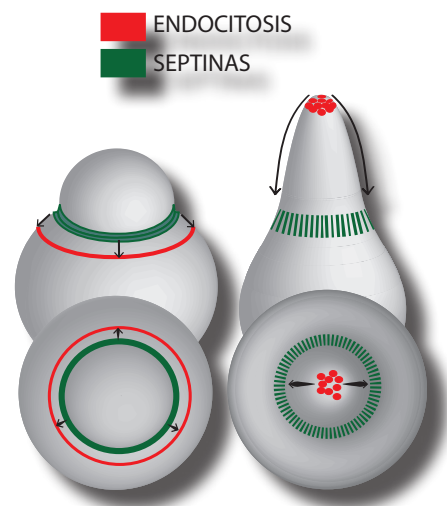
### Chs3 se escapa de la endocitosis durante el crecimiento hiperpolarizado

Durante el crecimiento hiperpolarizado característico de conjugación la situación es muy distinta. Las septinas se ensamblan en la base de la proyección, mientras que los parches de actina se localizan muy concentrados en la punta del *shmoo*. Nótese, por tanto, una inversión en la disposición relativa de ambos componentes (Figura 9), lo que va a determinar el desacoplamiento entre el transporte polarizado y la endocitosis para Chs3.

Se ha descrito para ciertas proteínas de membrana, como Snc1, que su polarización durante conjugación depende de una endocitosis muy activa (Bagnat & Simons, 2002; Valdez-Taubas & Pelham, 2003), proponiéndolo como mecanismo general de polarización. Éste, no obstante, no parece ser el caso de Chs3. Snc1 tiende a concentrarse en la punta del *shmoo*, sin embargo Chs3 aparece distribuida uniformemente por toda la proyección. Además, el tratamiento con la LatA no altera significativamente la localización de Chs3 en la membrana, pero la inhibición de la endocitosis sí afecta a Snc1, pasando precisamente a distribuirse de manera similar a como lo hace Chs3. Por último, Chs3 se localiza correctamente en la MP independientemente de la presencia o no de Chs4, otra evidencia de que durante el crecimiento hiperpolarizado Chs3 no depende de la endocitosis.

Esta regulación diferencial de las dos proteínas durante conjugación no es caprichosa, puesto que responde a distintos papeles de las mismas en este proceso. Parece lógico que Snc1 deba concentrarse en la punta del *shmoo*, puesto que es donde se está produciendo una fusión continua de membranas. Sin embargo, un comportamiento idéntico de Chs3 podría ser crítico en la naturaleza, ya que promovería la síntesis de una capa de quitina en la punta del *shmoo* que dificultaría enormemente el proceso de fusión con la célula de sexo contrario.

Además, este sistema de regulación de Chs3 parece también válido para otras formas de crecimiento hiperpolarizado, como es el crecimiento micelial de *C. albicans*. La capacidad de Chs3 para difundir rápidamente desde la punta de la hifa hacia la membrana subyacente permite que la síntesis de quitina no tenga lugar en la punta de la hifa, donde entorpecería la elongación del micelio, sino unas micras por debajo donde actúa reforzando la estructura tubular. Además, la menor endocitosis de Chs3 en la hifa contribuiría al incremento en la síntesis de quitina que se observa en la transición levadura/hifa en *C. albicans*.



**Figura 9.** Disposición de las septinas y la zona de endocitosis durante el crecimiento vegetativo (izquierda) y conjugación (derecha). Las flechas indican la difusión de Chs3.

Es interesante considerar cómo en dos contextos caracterizados por un cambio en la disposición relativa de los parches de actina respecto al anillo de septinas (crecimiento vegetativo vs conjugación), la simple diferencia en la capacidad de difusión de Snc1 y Chs3 permitiría explicar una regulación diferencial de estas dos proteínas. Debido a una hipotética mayor velocidad de difusión de Chs3 respecto a Snc1, la primera requeriría un anclaje físico (septinas) durante el crecimiento vegetativo para evitar ser endocitada rápidamente. Por su parte, Snc1 puede prescindir de este anclaje, ya que al moverse más lentamente tendría tiempo para concentrarse en la región del cuello antes de entrar en contacto con el anillo de parches de actina. Durante conjugación, la maquinaria endocítica está extremadamente polarizada lo que reduce la superficie de endocitosis. Una proteína con una tasa de difusión elevada, como sería Chs3, escaparía fácilmente de la endocitosis distribuyéndose a lo largo del *shmoo*. Por el contrario, la menor tasa de difusión de Snc1 le permitiría mantener también en este estadio un equilibrio entre el transporte anterógrado y la endocitosis.

¿Por qué si Chs3 es una proteína transmembrana poseería una velocidad de difusión mayor a la que supuestamente le corresponde? La respuesta la encontramos en su interacción con Chs4. Chs4 es una proteína anclada a la MP mediante una cola de prenilación y que por tanto se mueve muy rápidamente por la MP (Layton et al., 2011). Tenemos evidencias de que la interacción entre Chs3 y Chs4 modifica las propiedades de Chs3 en la MP incrementando su tasa de difusión lateral. Futuras líneas de trabajo en el laboratorio intentarán confirmar estas observaciones.

## 6. VISIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Con este trabajo hemos puesto las bases moleculares para profundizar en el estudio de los mecanismos subyacentes a la regulación del tráfico intracelular de Chs3. Gracias a la asignación específica de papeles definidos a cada uno de los dominios de Chs3, estamos ahora en disposición de empezar a plantear modelos de cómo el resto de proteínas Chs, clatrina, septinas y parches de actina se organizan para localizar a Chs3 en el cuello en momentos muy discretos del ciclo celular.

Nuestro trabajo sugiere que clatrina y exómero están estrechamente coordinados gracias a su reclutamiento en dos regiones distintas de Chs3. Este hallazgo abre la puerta al análisis más cuidadoso de un hipotético papel de las modificaciones postraduccionales de Chs3 en la capacidad para reclutar estas cubiertas, y que por tanto podría ser uno de los mecanismos implicados en la regulación de Chs3 a lo largo del ciclo.

Finalmente, hemos descrito cómo los parches de actina y las septinas delimitan un dominio de membrana en el cual reside Chs3. Una serie de trabajos recientes sostienen que el cuello es una región enriquecida en  $\text{PIP}_2$  y fosfatidilserina (Fairn et al., 2011; Garrenton et al., 2010), lo cual podría sugerir que Chs3 está embebida en un entorno lipídico característico y cuya relación con el mismo a su vez pudiera ser modulado por la interacción con Chs4. El auge creciente de la lipidómica y de la caracterización de los dominios de membrana hacen de éste un momento idóneo para empezar a abordar este estudio.



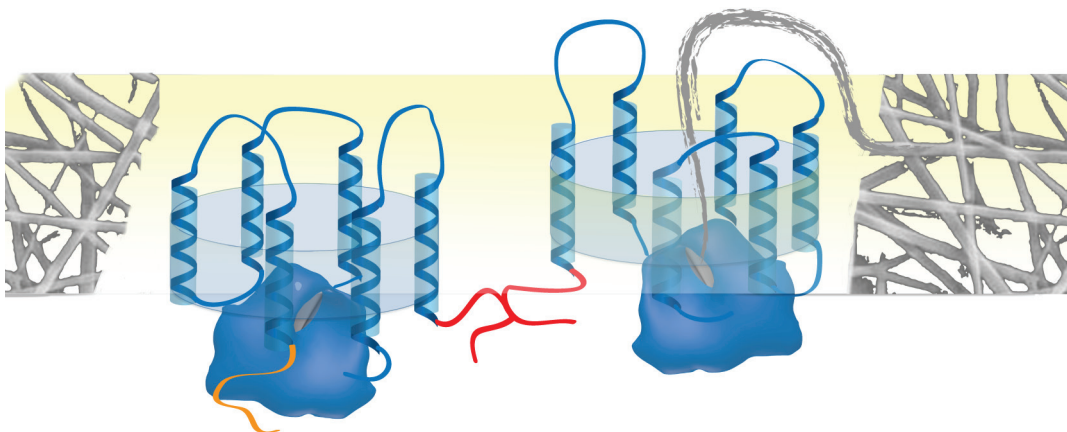


# C Conclusiones





1. Chs3 es una proteína politópica cuya topología consta de seis hélices transmembrana que delimitan tres dominios citoplasmáticos importantes para el tráfico intracelular de la proteína: los extremos N- y C-terminales, y una región globular central que contiene el dominio catalítico y es esencial para mantener la estructura global de Chs3. Un cuarto dominio sería luminal, estando sujeto a N-glicosilación.
2. El dominio N-terminal de Chs3 media la dimerización entre moléculas de proteína en el RE. La salida de Chs3 del retículo endoplasmático es mediada por el adaptador Erv14, de manera que ni la dimerización ni Chs7 son requeridos para la interacción de Chs3 con este adaptador.
3. El grado de dimerización de Chs3 es monitorizado en el aparato de Golgi por un sistema de control de calidad dependiente de Rer1. Este sistema media el retorno de los monómeros de Chs3 al retículo endoplasmático en vesículas COPI para promover su ensamblaje en dímeros.
4. El dominio C-terminal ejerce múltiples papeles en la función de Chs3: es necesario para la salida de Chs3 del TGN mediando la interacción con la subunidad Chs6 del exómero; contiene un motivo dilisina que es reconocido por la cubierta COPI en el retorno de monómeros al retículo endoplasmático; y además este dominio es necesario para la actividad QSIII.
5. El dominio N-terminal de Chs3 es esencial en la membrana plasmática para que el complejo QSIII se endocite eficientemente y dé lugar a una quitina correctamente ensamblada.
6. El equilibrio entre el transporte anterógrado y la endocitosis, que permite la localización de Chs3 en el cuello durante el crecimiento vegetativo, se establece gracias al posicionamiento específico de la maquinaria endocítica alrededor del anillo de septinas. El desacoplamiento de ambas estructuras durante el crecimiento hiperpolarizado determina la acumulación de Chs3 en la membrana plasmática independientemente de la endocitosis.



Representación de un dímero del complejo QSIII en la membrana plasmática sintetizando quitina



# Bibliografía





En esta sección se recogen las referencias de la introducción, las presentaciones de cada capítulo y la discusión general. Las citas a las que se hace referencia en los manuscritos de los que consta cada capítulo están recogidas en los mismos.

- Abrami, L., Kunz, B., Iacovache, I. and van der Goot, F. G.** (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.
- Albuquerque, C. P., Smolka, M. B., Payne, S. H., Bafna, V., Eng, J. and Zhou, H.** (2008). A multi-dimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol. Cell Proteomics* **7**, 1389–1396.
- Anand, V. C., Daboussi, L., Lorenz, T. C. and Payne, G. S.** (2009). Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 1592–1604.
- Anitei, M. and Hoflack, B.** (2011). Exit from the *trans*-Golgi network: from molecules to mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 443–451.
- Arighi, C. N.** (2004). Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J. Cell Biol.* **165**, 123–133.
- Atanassov, I. I., Pittman, J. K. and Turner, S. R.** (2009). Elucidating the mechanisms of assembly and subunit interaction of the cellulose synthase complex of *Arabidopsis* secondary cell walls. *J Biol Chem* **284**, 3833–3841.
- Bagnat, M. and Simons, K.** (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 14183–14188.
- Balderhaar, H. J. K., Arlt, H., Ostrowicz, C., Brocker, C., Sundermann, F., Brandt, R., Babst, M. and Ungermann, C.** (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J. Cell. Sci.* **123**, 4085–4094.
- Banks, I. R., Specht, C. A., Donlin, M. J., Gerik, K. J., Levitz, S. M. and Lodge, J. K.** (2005). A chitin synthase and its regulator protein are critical for chitosan production and growth of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **4**, 1902–1912.
- Bard, F. and Malhotra, V.** (2006). The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 439–455.
- Bardwell, L.** (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**, 339–350.
- Barfield, R. M., Fromme, J. C. and Schekman, R.** (2009). The Exomer Coat Complex Transports Fus1p to the Plasma Membrane via a Novel Plasma Membrane Sorting Signal in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 4985–4996.
- Bassett, D. E., Boguski, M. S. and Hieter, P.** (1996). Yeast genes and human disease. *Nature* **379**, 589–590.
- Berchtold, D. and Walther, T.** (2009). TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain. *Molecular Biology of the Cell.* **20**, 1565–1575.
- Bi, E. and Park, H.-O.** (2012). Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347–387.
- Boehm, M. and Bonifacino, J. S.** (2001). Adaptins: the final recount. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2907–2920.
- Boettner, D. R., Chi, R. J. and Lemmon, S. K.** (2012). Lessons from yeast for clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* **14**, 2–10.
- Bonifacino, J. S.** (2004a). The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell* **116**, 153–166.
- Bonifacino, J. S.** (2004b). The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 23–32.
- Bonifacino, J. S. and Hierro, A.** (2011). Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.* **21**, 159–167.
- Bowers, K. and Stevens, T. H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1744**, 438–454.
- Brach, T., Specht, T. and Kaksonen, M.** (2011). Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J. Cell. Sci.* **124**, 328–337.
- Breidenbach, M. A., Palaniappan, K. K., Pitcher, A. A. and Bertozzi, C. R.** (2012). Mapping yeast N-glycosites with isotopically recoded glycans. *Mol. Cell Proteomics* **11**, M111.015339.

- Brodsky, J. L. and Skach, W. R.** (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**, 464–475.
- Bröcker, C., Engelbrecht-Vandré, S. and Ungermann, C.** (2010). Multisubunit Tethering Complexes and Their Role in Membrane Fusion. *Current Biology* **20**, R943–R952.
- Bulawa, C. E.** (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**, 505–534.
- Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L., Jr. and Robbins, P. W.** (1986). The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis *in vivo*. *Cell* **46**, 213–225.
- Cabib, E., Blanco, N. and Arroyo, J.** (2012). Presence of a large  $\beta(1-3)$ glucan linked to chitin at the *Saccharomyces cerevisiae* mother-bud neck suggests involvement in localized growth control. *Eukaryotic Cell* **11**, 388–400.
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. and Varma, A.** (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* **276**, 19679–82.
- Cabib, E. and Schmidt, M.** (2003). Chitin synthase III activity, but not the chitin ring, is required for remedial septa formation in budding yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **224**, 299–305.
- Cabib, E., Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B. and Choi, W. J.** (1996). Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology*, (eds R. Brambl and G. A. Marzluf), pp. 243–267. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Carpita, N. C.** (2011). Update on mechanisms of plant cell wall biosynthesis: how plants make cellulose and other (1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glycans. *Plant Physiol.* **155**, 171–184.
- Carvalho, P., Goder, V. and Rapoport, T. A.** (2006). Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* **126**, 361–373.
- Castillon, G. A., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Epstein, S., Kajiwara, K., Funato, K., Watanabe, R., Riezman, H. and Muñiz, M.** (2011). The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2924–2936.
- Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M. E. and Riezman, H.** (2009). Concentration of GPI-Anchored Proteins upon ER Exit in Yeast. *Traffic* **10**, 186–200.
- Chang, X.-B., Mengos, A., Hou, Y.-X., Cui, L., Jensen, T. J., Aleksandrov, A., Riordan, J. R. and Gentzsch, M.** (2008). Role of N-linked oligosaccharides in the biosynthetic processing of the cystic fibrosis membrane conductance regulator. *J. Cell. Sci.* **121**, 2814–2823.
- Chen, S. H., Chen, S., Tokarev, A. A., Liu, F., Jedd, G. and Segev, N.** (2005). Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 178–192.
- Chen, S. H., Shah, A. H. and Segev, N.** (2011). Ypt31/32 GTPases and their F-Box effector Rcy1 regulate ubiquitination of recycling proteins. *cellularlogistics* **1**, 21–31.
- Choi, W. J., Sburlati, A. and Cabib, E.** (1994). Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the *CAL1* and the *CAL3* genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 4727–4730.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. and Sanchez, M.** (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**, 345–86.
- Chuang, J. S. and Schekman, R. W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J. Cell Biol.* **135**, 597–610.
- Collins, B. M.** (2008). The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic* **9**, 1811–1822.
- Conibear, E. and Stevens, T. H.** (1998). Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1404**, 211–230.
- Copic, A., Starr, T. L. and Schekman, R.** (2007). Ent3p and Ent5p Exhibit Cargo-specific Functions in Trafficking Proteins between the Trans-Golgi Network and the Endosomes in Yeast. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 1803–1815.
- Cos, T., Ford, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E. and Roncero, C.** (1998). Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* **256**, 419–426.
- Cosgrove, D. J.** (2005). Growth of the plant cell wall. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 850–861.
- Costaguta, G., Duncan, M. C., Fernández, G. E., Huang, G. H. and Payne, G. S.** (2006). Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 3907–3920.



- Coughlan, C. M., Walker, J. L., Cochran, J. C., Wittrup, K. D. and Brodsky, J. L.** (2004). Degradation of mutated bovine pancreatic trypsin inhibitor in the yeast vacuole suggests post-endoplasmic reticulum protein quality control. *J Biol Chem* **279**, 15289–15297.
- Cullen, P. J. and Korswagen, H. C.** (2011). Sorting nexins provide diversity for retromer-dependent trafficking events. *Nat Cell Biol* **14**, 29–37.
- Daboussi, L., Costaguta, G. and Payne, G. S.** (2012). Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the *trans*-Golgi network. *Nat Cell Biol* **14**, 239–248.
- Dancourt, J. and Barlowe, C.** (2010). Protein sorting receptors in the early secretory pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 777–802.
- DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. and Pringle, J. R.** (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J. Cell Biol.* **139**, 75–93.
- Dobbelaere, J. and Barral, Y.** (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* **305**, 393–396.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B. and Schekman, R.** (1994). Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J Biol Chem* **269**, 24486–24495.
- Duncan, M. C., Costaguta, G. and Payne, G. S.** (2003). Yeast epsin-related proteins required for Golgi-endosome traffic define a gamma-adaptin ear-binding motif. *Nat Cell Biol* **5**, 77–81.
- Ellgaard, L. and Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 181–191.
- Endler, A. and Persson, S.** (2011). Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis*. *Mol Plant* **4**, 199–211.
- Epp, N., Rethmeier, R., Krämer, L. and Ungermann, C.** (2011). Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles – Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *European Journal of Cell Biology* **90**, 779–785.
- Eugster, A., Frigerio, G., Dale, M. and Duden, R.** (2004a). The alpha- and beta'-COP WD40 domains mediate cargo-selective interactions with distinct di-lysine motifs. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1011–1023.
- Eugster, A., Pécheur, E.-I., Michel, F., Winsor, B., Letourneur, F. and Friant, S.** (2004b). Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 3031–3041.
- Fairn, G. D., Hermansson, M., Somerharju, P. and Grinstein, S.** (2011). Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat Cell Biol* **13**, 1424–1430.
- Fang, X., Luo, J., Nishihama, R., Wloka, C., Dravis, C., Travaglia, M., Iwase, M., Vallen, E. A. and Bi, E.** (2010). Biphasic targeting and cleavage furrow ingression directed by the tail of a myosin II. *J. Cell Biol.* **191**, 1333–1350.
- Foote, C. and Nothwehr, S. F.** (2006). The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *J. Cell Biol.* **173**, 615–626.
- Forsmark, A., Rossi, G., Wadskog, I., Brenwald, P., Warringer, J. and Adler, L.** (2011). Quantitative proteomics of yeast post-Golgi vesicles reveals a discriminating role for Sro7p in protein secretion. *Traffic* **12**, 740–753.
- Fujita, M. and Kinoshita, T.** (2012). GPI-anchor remodeling: Potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 1050–1058.
- Gabriely, G., Kama, R. and Gerst, J. E.** (2007). Involvement of specific COPI subunits in protein sorting from the late endosome to the vacuole in yeast. *Molecular and Cellular Biology* **27**, 526–540.
- García-Rodríguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Roncero, C.** (2000). Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fk1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **478**, 84–88.
- Garrenton, L. S., Stefan, C. J., McMurray, M. A., Emr, S. D. and Thorner, J.** (2010). Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 11805–11810.
- Gillingham, A. K. and Munro, S.** (2007). The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 579–611.

- Gilstring, C. F., Melin-Larsson, M. and Ljungdahl, P. O.** (1999). Shr3p mediates specific COPII coatomer-cargo interactions required for the packaging of amino acid permeases into ER-derived transport vesicles. *Molecular Biology of the Cell* **10**, 3549–3565.
- Grabińska, K. A., Magnelli, P. and Robbins, P. W.** (2007). Prenylation of *Saccharomyces cerevisiae* Chs4p Affects Chitin Synthase III activity and chitin chain length. *Eukaryotic Cell* **6**, 328–336.
- Graham, T. R. and Burd, C. G.** (2011). Coordination of Golgi functions by phosphatidylinositol 4-kinases. *Trends Cell Biol.* **21**, 113–121.
- Grossmann, G., Malinsky, J., Stahlschmidt, W., Loibl, M., Weig-Meckl, I., Frommer, W. B., Opekárova, M. and Tanner, W.** (2008). Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *J. Cell Biol.* **183**, 1075–1088.
- Ha, S.-A., Torabinejad, J., DeWald, D. B., Wenk, M. R., Lucast, L., De Camilli, P., Newitt, R. A., Aebersold, R. and Nothwehr, S. F.** (2003). The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 1319–1333.
- Hammer, J. A. and Sellers, J. R.** (2011). Walking to work: roles for class V myosins as cargo transporters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 13–26.
- Harsay, E.** (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J. Cell Biol.* **156**, 271–286.
- Harsay, E. and Bretscher, A.** (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J. Cell Biol.* **131**, 297–310.
- Henne, W. M., Buchkovich, N. J. and Emr, S. D.** (2011). The ESCRT Pathway. *Dev. Cell* **21**, 77–91.
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S. and 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.
- Hématy, K., Cherk, C. and Somerville, S.** (2009). Host-pathogen warfare at the plant cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 406–413.
- Hirst, J., Barlow, L. D., Francisco, G. C., Sahlender, D. A., Seaman, M. N. J., Dacks, J. B. and Robinson, M. S.** (2011). The Fifth Adaptor Protein Complex. *PLoS Biol.* **9**, e1001170.
- Holthuis, J. C., Nichols, B. J. and Pelham, H. R.** (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 3383–3397.
- Horiuchi, H., Fujiwara, M., Yamashita, S., Ohta, A. and Takagi, M.** (1999). Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **181**, 3721–3729.
- Howell, G. J., Holloway, Z. G., Cobbold, C., Monaco, A. P. and Ponnambalam, S.** (2006). Cell biology of membrane trafficking in human disease. *Int. Rev. Cytol.* **252**, 1–69.
- Hung, C.-W. W., Aoh, Q. L., Joglekar, A. P., Payne, G. S. and Duncan, M. C.** (2012). Adaptor auto-regulation promotes coordinated binding within the clathrin coat. *J Biol Chem.* **287**, 17398–17407.
- Hurley, J. H. and Hanson, P. I.** (2010). Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 556–566.
- Jensen, D. and Schekman, R.** (2011). COPII-mediated vesicle formation at a glance. *J. Cell. Sci.* **124**, 1–4.
- Jiménez-Ortigosa, C., Aïmanianda, V., Muszkieta, L., Mouyna, I., Alsteens, D., Pire, S., Beau, R., Krappmann, S., Beauvais, A., Dufrêne, Y. F., et al.** (2012). Chitin synthases with a myosin motor-like domain controls the resistance of *Aspergillus fumigatus* to echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. En prensa.
- Jin, Y., Sultana, A., Gandhi, P., Franklin, E., Hamamoto, S., Khan, A. R., Munson, M., Schekman, R. and Weisman, L. S.** (2011). Myosin V transports secretory vesicles via a Rab GTPase cascade and interaction with the exocyst complex. *Dev. Cell* **21**, 1156–1170.
- Kaether, C., Scheuermann, J., Fassler, M., Zilow, S., Shirotani, K., Valkova, C., Novak, B., Kacmar, S., Steiner, H. and Haass, C.** (2007). Endoplasmic reticulum retention of the gamma-secretase complex component Pen2 by Rer1. *EMBO Rep.* **8**, 743–748.
- Kawaguchi, S., Hsu, C.-L. and Ng, D. T. W.** (2010). Interplay of substrate retention and export signals in endoplasmic reticulum quality control. *PLoS ONE* **5**, e15532.
- Kincaid, M. M. and Cooper, A. A.** (2007). Misfolded proteins traffic from the endoplasmic reticulum (ER) due to ER export signals. *Molecular Biology of the Cell* **18**, 455–463.

- Khurana, V. and Lindquist, S.** (2010). Modelling neurodegeneration in *Saccharomyces cerevisiae*: why cook with baker's yeast? *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 436–449.
- Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W. J.** (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185–202.
- Kota, J. and Ljungdahl, P. O.** (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J. Cell Biol.* **168**, 79–88.
- Kota, J., Gilstring, C. F. and Ljungdahl, P. O.** (2007). Membrane chaperone Shr3 assists in folding amino acid permeases preventing precocious ERAD. *J. Cell Biol.* **176**, 617–628.
- Koushab F. and Montarop Y.** (2010). Chitin Research Revisited. *Marine Drugs* **8**, 1988.
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D. J. and Tatchell, K.** (2003). A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 26–39.
- Lam, K. K. Y., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G. and Conibear, E.** (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J. Cell Biol.* **174**, 19–25.
- Larson, J. R., Bharucha, J. P., Ceaser, S., Salamon, J., Richardson, C. J., Rivera, S. M. and Tatchell, K.** (2008). Protein phosphatase type 1 directs chitin synthesis at the bud neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 3040–3051.
- Latge, J.-P.** (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol. Microbiol.* **66**, 279–290.
- Lauwers, E., Erpapazoglou, Z., Haguenaer-Tsapis, R. and André, B.** (2010). The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol.* **20**, 196–204.
- Layton, A. T., Savage, N. S., Howell, A. S., Carroll, S. Y., Drubin, D. G. and Lew, D. J.** (2011). Modeling Vesicle Traffic Reveals Unexpected Consequences for Cdc42p-Mediated Polarity Establishment. *Current Biology* **21**, 184–194.
- Lee, K. K., MacCallum, D. M., Jacobsen, M. D., Walker, L. A., Odds, F. C., Gow, N. A. R. and Munro, C. A.** (2011). Elevated Cell Wall Chitin in *Candida albicans* Confers Echinocandin Resistance *In Vivo*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**, 208–217.
- Lenardon, M. D., Milne, S. A., Mora-Montes, H. M., Kaffarnik, F. A. R., Peck, S. C., Brown, A. J. P., Munro, C. A. and Gow, N. A. R.** (2010). Phosphorylation regulates polarisation of chitin synthesis in *Candida albicans*. *J. Cell. Sci.* **123**, 2199–2206.
- Lenardon, M. D., Whitton, R. K., Munro, C. A., Marshall, D. and Gow, N. A. R.** (2007). Individual chitin synthase enzymes synthesize microfibrils of differing structure at specific locations in the *Candida albicans* cell wall. *Mol. Microbiol.* **66**, 1164–1173.
- Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C. A., Sdicu, A.-M., Ménard, P., Hussein, S., Tong, A. H. Y., Boone, C. and Bussey, H.** (2005). An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* **6**, 8.
- Lesage, G. and Bussey, H.** (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**, 317–343.
- Leto, D. and Saltiel, A. R.** (2012). Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 383–396.
- Levin, D. E.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 262–291.
- Lewis, M. J. and Pelham, H. R.** (1992). Sequence of a second human KDEL receptor. *Journal of Molecular Biology* **226**, 913–916.
- Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. and Pelham, H. R.** (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Molecular Biology of the Cell* **11**, 23–38.
- Li, X., Gerber, S. A., Rudner, A. D., Beausoleil, S. A., Haas, W., Villén, J., Elias, J. E. and Gygi, S. P.** (2007). Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* **6**, 1190–1197.
- Liu, K., Surendhran, K., Nothwehr, S. F. and Graham, T. R.** (2008). P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 3526–3535.
- Liu, T.-T., Gomez, T. S., Sackey, B. K., Billadeau, D. D. and Burd, C. G.** (2012). Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 2505–2515.

- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J. and Glick, B. S.** (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* **441**, 1002–1006.
- MacGurn, J. A., Hsu, P.-C. and Emr, S. D.** (2012). Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 231–259.
- Madrid, M. P., Di Pietro, A. and Roncero, M. I. G.** (2003). Class V chitin synthase determines pathogenesis in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* and mediates resistance to plant defence compounds. *Mol. Microbiol.* **47**, 257–266.
- Malínská, K., Malinsky, J., Opekarová, M. and Tanner, W.** (2003). Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 4427–4436.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. and Emr, S. D.** (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell* **77**, 579–586.
- Martín-García, R., León, N., Sharifmoghadam, M. R., Curto, M.-Á., Hoya, M., Bustos-Sanmamed, P. and Valdivieso, M. H.** (2010). The FN3 and BRCT motifs in the exomer component Chs5p define a conserved module that is necessary and sufficient for its function. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**, 2907–2917.
- Matsuura-Tokita, K., Takeuchi, M., Ichihara, A., Mikuriya, K. and Nakano, A.** (2006). Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation. *Nature* **441**, 1007–1010.
- McGough, I. J. and Cullen, P. J.** (2011). Recent advances in retromer biology. *Traffic* **12**, 963–971.
- McGough, I. J. and Cullen, P. J.** (2012) Clathrin is not required for SNX-BAR-retromer mediated carrier formation. *J. Cell. Sci.* En Prensa
- Meissner, D., Odman-Naresh, J., Vogelpohl, I. and Merzendorfer, H.** (2010). A Novel Role of the Yeast CaaX Protease Ste24 in Chitin Synthesis. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 2425–2433.
- Merzendorfer, H.** (2011). The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences. *European Journal of Cell Biology* **90**, 759–769.
- Moreira, K. E., Schuck, S., Schrul, B., Fröhlich, F., Moseley, J. B., Walther, T. C. and Walter, P.** Seg1 controls eisosome assembly and shape. *J. Cell Biol.* **198**, 405–420.
- Moremen, K. W., Tiemeyer, M. and Nairn, A. V.** (2012). Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 448–462.
- Mostowy, S. and Cossart, P.** (2012). Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 183–194.
- Motoyama, T., Fujiwara, M., Kojima, N., Horiuchi, H., Ohta, A. and Takagi, M.** (1997). The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation [corrected and republished article originally appeared in *Mol Gen Genet* 1996 Jun; 251(4):442-50]. *Mol. Gen. Genet.* **253**, 520–528.
- Munro, S.** (2003). Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell* **115**, 377–388.
- Mutwil, M., Debolt, S. and Persson, S.** (2008). Cellulose synthesis: a complex complex. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 252–257.
- Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H.** (1995). Characterization of Chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 13961-13967.
- O'Donnell, A. F., Apffel, A., Gardner, R. G. and Cyert, M. S.** (2010).  $\alpha$ -Arrestins Aly1 and Aly2 Regulate Intracellular Trafficking in Response to Nutrient Signaling. *Molecular Biology of the Cell* **21**, 3552–3566.
- Oh, Y. and Bi, E.** (2011). Septin structure and function in yeast and beyond. *Trends Cell Biol.* **21**, 141–148.
- Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R. and Nakano, A.** (2012). High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.*
- Olivera-Couto, A., Grana, M., Harispe, L. and Aguilar, P. S.** (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2360–2372.
- Ono, N., Yabe, T., Sudoh, M., Nakajima, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H.** (2000). The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology (Reading, Engl.)* **146 ( Pt 2)**, 385–391.

- Orlando, K., Sun, X., Zhang, J., Lu, T., Yokomizo, L., Wang, P. and Guo, W.** (2011). Exo-endocytic trafficking and the septin-based diffusion barrier are required for the maintenance of Cdc42p polarization during budding yeast asymmetric growth. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 624–633.
- Ortiz, D. and Novick, P. J.** (2006). Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *European Journal of Cell Biology* **85**, 107–116.
- Paczkowski, J. E., Richardson, B. C., Strassner, A. M. and Fromme, J. C.** (2012). The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* En prensa.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 867.
- Palecek, S. P., Parikh, A. S. and Kron, S. J.** (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology (Reading, Engl.)* **148**, 893–907.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotech* **21**, 921–926.
- Perez, P. and Rincón, S. A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* **426**, 243–253.
- Popoff, V., Adolf, F., Brügger, B. and Wieland, F.** (2011). COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **3**, a005231.
- Popoff, V., Mardones, G. A., Bai, S.-K., Chambon, V., Tenza, D., Burgos, P. V., Shi, A., Benaroch, P., Urbé, S., Lamaze, C., et al.** (2009). Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic* **10**, 1868–1880.
- Prescianotto-Baschong, C. and Riezman, H.** (1998). Morphology of the yeast endocytic pathway. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 173–189.
- Prosser, D. C., Drivas, T. G., Maldonado-Baez, L. and Wendland, B.** (2011). Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J. Cell Biol.* **195**, 657–671.
- Proszynski, T. J., Klemm, R., Bagnat, M., Gaus, K. and Simons, K.** (2006). Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J. Cell Biol.* **173**, 861–866.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A. and Roncero, C.** (2007). Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J. Cell. Sci.* **120**, 1998–2009.
- Risselada, H. J. and Grubmüller, H.** (2012). How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **22**, 187–196.
- Robinson, M. S., Sahlender, D. A. and Foster, S. D.** (2010). Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev. Cell* **18**, 324–331.
- Rockenbach, U., Ritz, A. M., Sacristan, C., Roncero, C. and Spang, A.** (2012). The complex interactions of Chs5p, the ChAPs and the cargo Chs3p. *Molecular Biology of the Cell.* En prensa.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics* **41**, 367–378.
- Roncero, C. and Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: *in vivo* activation of chitin polymerization. **163**, 1180–1185.
- Roncero, C. and Sánchez, Y.** (2010). Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast* **27**, 521–530.
- Ruiz-Herrera, J. and Xoconostle-Cazares, B.** (1995). Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. *Arch. Med. Res.* **26**, 315–321.
- Sanchatjate, S. and Schekman, R.** (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the *trans*-Golgi network to the cell surface. *Molecular Biology of the Cell* **17**, 4157–4166.
- Santiago-Tirado, F. H. and Bretscher, A.** (2011). Membrane-trafficking sorting hubs: cooperation between PI4P and small GTPases at the *trans*-Golgi network. *Trends Cell Biol.* **21**, 515–525.
- Santos, B. and Snyder, M.** (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**, 95–110.
- Santos, B. and Snyder, M.** (2003). Specific protein targeting during cell differentiation: polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **2**, 821–825.
- Santos, B., Duran, A. and Valdivieso, M. H.** (1997). *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 2485–2496.

- Sanz, M., Carrano, L., Jimenez, C., Candiani, G., Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C.** (2005). *Candida albicans* strains deficient in *CHS7*, a key regulator of chitin synthase III, exhibit morphogenetic alterations and attenuated virulence. *Microbiology (Reading, Engl.)* **151**, 2623–2636.
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A. and Roncero, C.** (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology (Reading, Engl.)* **150**, 3229–3241.
- Sanz, M., Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C.** (2002). Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Mol. Microbiol.* **43**, 1183–1195.
- Sato, K., Sato, M. and Nakano, A.** (2001). Rer1p, a retrieval receptor for endoplasmic reticulum membrane proteins, is dynamically localized to the Golgi apparatus by coatomer. *J. Cell Biol.* **152**, 935–944.
- Sato, K., Sato, M. and Nakano, A.** (2003). Rer1p, a retrieval receptor for ER membrane proteins, recognizes transmembrane domains in multiple modes. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 3605–3616.
- Sato, M., Sato, K. and Nakano, A.** (2004). Endoplasmic reticulum quality control of unassembled iron transporter depends on Rer1p-mediated retrieval from the golgi. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 1417–1424.
- Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D.-H. and Cabib, E.** (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J. Cell. Sci.* **115**, 293–302.
- Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N. and Mayinger, P.** (2001). The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr. Biol.* **11**, 1421–1426.
- Schuster, M., Treitschke, S., Kilaru, S., Molloy, J., Harmer, N. J. and Steinberg, G.** (2011). Myosin-5, kinesin-1 and myosin-17 cooperate in secretion of fungal chitin synthase. *EMBO J.* **31**, 214–227.
- Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Kearney, W. R., Robertson, A. D., Boman, A. L. and Piper, R. C.** (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 8–259.
- Seaman, M. N. J.** (2005). Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* **15**, 68–75.
- Segev, N.** (2001). Ypt/Rab GTPases: Regulators of Protein Trafficking. *Science Signaling* **2001**, re11.
- Shao, S. and Hegde, R. S.** (2011). Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 25–56.
- Silverman, S. J.** (1989). Similar and different domains of chitin synthases 1 and 2 of *S. cerevisiae*: two isozymes with distinct functions. *Yeast* **5**, 459–467.
- Simons, K. and Gerl, M. J.** (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 688–699.
- Simons, K. and Ikonen, E.** (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**, 569–572.
- Siniosoglou, S. and Pelham, H. R. B.** (2002). Vps51p links the VFT complex to the SNARE Tlg1p. *J Biol Chem* **277**, 48318–48324.
- Smits, G. J., van den Ende, H. and Klis, F. M.** (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**, 781–784.
- Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S.-H. and Zhou, H.** (2007). Proteome-wide identification of *in vivo* targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 10364–10369.
- Somerville, C.** (2006). Cellulose synthesis in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**, 53–78.
- Spang, A.** (2009a). On vesicle formation and tethering in the ER–Golgi shuttle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 531–536.
- Spang, A.** (2009b). On the fate of early endosomes. *Biological Chemistry* **390**, 753–759.
- Spasic, D., Raemaekers, T., Dillen, K., Declerck, I., Baert, V., Serneels, L., Füllekrug, J. and Annaert, W.** (2007). Rer1p competes with APH-1 for binding to nicastrin and regulates gamma-secretase complex assembly in the early secretory pathway. *J. Cell Biol.* **176**, 629–640.
- Specht, C. A., Liu, Y., Robbins, P. W., Bulawa, C. E., Iartchouk, N., Winter, K. R., Riggle, P. J., Rhodes, J. C., Dodge, C. L., Culp, D. W., et al.** (1996). The *chsD* and *chsE* genes of *Aspergillus nidulans* and their roles in chitin synthesis. *Fungal Genet. Biol.* **20**, 153–167.
- Spira, F., Mueller, N. S., Beck, G., Olshausen, von, P., Beig, J. and Wedlich-Söldner, R.** (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol.* **14**, 640–648.

- Starr, T. L., Pagant, S., Wang, C.W. and Schekman, R.** (2012). Sorting Signals That Mediate Traffic of Chitin Synthase III between the TGN/Endosomes and to the Plasma Membrane in Yeast. *PLoS ONE* **7**, e46386.
- Steinberg, G.** (2011). Motors in fungal morphogenesis: cooperation versus competition. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 660–667.
- Stimpson, H. E. M., Toret, C. P., Cheng, A. T., Pauly, B. S. and Drubin, D. G.** (2009). Early-Arriving Syp1p and Ede1p Function in Endocytic Site Placement and Formation in Budding Yeast. *Molecular Biology of the Cell* **20**, 4640–4651.
- Strochlic, T. I., Schmiedekamp, B. C., Lee, J., Katzmann, D. J. and Burd, C. G.** (2008). Opposing Activities of the Snx3-Retromer Complex and ESCRT Proteins Mediate Regulated Cargo Sorting at a Common Endosome. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4694–4706.
- Strochlic, T. I., Setty, T. G., Sitaram, A. and Burd, C. G.** (2007). Grd19/Snx3p functions as a cargo-specific adapter for retromer-dependent endocytic recycling. *J. Cell Biol.* **177**, 115–125.
- Suda, Y. and Nakano, A.** (2011). The Yeast Golgi Apparatus. *Traffic.* **13**, 505–510.
- Tanner, W., Malinsky, J. and Opekarová, M.** (2011). In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts. *Plant Cell* **23**, 1191–1193.
- Teasdale, R. D. and Jackson, M. R.** (1996). Signal-mediated sorting of membrane proteins between the endoplasmic reticulum and the golgi apparatus. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 27–54.
- Teh, E. M., Chai, C. C. and Yeong, F. M.** (2009). Retention of Chs2p in the ER requires N-terminal CDK1-phosphorylation sites. *cc* **8**, 2965–2976.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E. and Spang, A.** (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J.* **25**, 943–954.
- Treitschke, S., Doehlemann, G., Schuster, M. and Steinberg, G.** (2010). The Myosin Motor Domain of Fungal Chitin Synthase V Is Dispensable for Vesicle Motility but Required for Virulence of the Maize Pathogen *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **22**, 2476–2494.
- Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A. and Roncero, C.** (1997). Characterization of *CHS4* (*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**, 795–807.
- Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C.** (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **145**, 1153–1163.
- Valdez-Taubas, J. and Pelham, H. R. B.** (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr. Biol.* **13**, 1636–1640.
- Valdivia, R. H. and Schekman, R.** (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 10287–10292.
- Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S. and Schekman, R. W.** (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev. Cell* **2**, 283–294.
- Valdivieso, M. H., Duran, A. and Roncero, C.** (2004). Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology*, 2nd Edition, (eds R. Brambl and G. A. Marzluf), pp. 275–290. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. and Popolo, L.** (2000). Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol* **182**, 4752–7.
- Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E. and Duran, A.** (1991). *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **114**, 101–109.
- Valkova, C., Albrizio, M., Röder, I. V., Schwake, M., Betto, R., Rudolf, R. and Kaether, C.** (2011). Sorting receptor Rer1 controls surface expression of muscle acetylcholine receptors by ER retention of unassembled alpha-subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 621–625.
- Vázquez-Martínez, R. and Malagón, M. M.** (2011). Rab proteins and the secretory pathway: the case of rab18 in neuroendocrine cells. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2**, 1.
- Vembar, S. S. and Brodsky, J. L.** (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 944–957.
- VerPlank, L. and Li, R.** (2005). Cell cycle-regulated trafficking of Chs2 controls actomyosin ring stability during cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 2529–2543.

- Walther, T. C., Brickner, J. H., Aguilar, P. S., Bernales, S., Pantoja, C. and Walter, P.** (2006). Iso-somes mark static sites of endocytosis. *Nat Cell Biol* **439**, 998–1003.
- Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R.** (2006). Exomer: a coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J. Cell Biol.* **174**, 973–983.
- Weber, I., Assmann, D., Thines, E. and Steinberg, G.** (2006). Polar localizing class V myosin chitin synthases are essential during early plant infection in the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Plant Cell* **18**, 225–242.
- Weinberg, J. and Drubin, D. G.** (2012). Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **22**, 1–13.
- Whittle, J. R. R. and Schwartz, T. U.** (2010). Structure of the Sec13-Sec16 edge element, a template for assembly of the COPII vesicle coat. *J. Cell Biol.* **190**, 347–361.
- Wloka, C., Nishihama, R., Onishi, M., Oh, Y., Hanna, J., Pringle, J. R., Krauss, M. and Bi, E.** (2011). Evidence that a septin diffusion barrier is dispensable for cytokinesis in budding yeast. *Biological Chemistry* **392**, 813–829.
- Yeung, B. G. and Payne, G. S.** (2001). Clathrin interactions with C-terminal regions of the yeast AP-1 beta and gamma subunits are important for AP-1 association with clathrin coats. *Traffic* **2**, 565–576.
- Yu, I.-M. and Hughson, F. M.** (2010). Tethering Factors as Organizers of Intracellular Vesicular Traffic. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 137–156.
- Zanolari, B., Rockenbauch, U., Trautwein, M., Clay, L., Barral, Y. and Spang, A.** (2011). Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **124**, 1055–1066.
- Ziman, M., Chuang, J. S. and Schekman, R. W.** (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Molecular Biology of the Cell* **7**, 1909–1919.
- Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S. and Schekman, R.** (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 1565–1576.
- Ziółkowska, N. E., Christiano, R. and Walther, T. C.** (2012). Organized living: formation mechanisms and functions of plasma membrane domains in yeast. *Trends Cell Biol.* 1–8.



# Apéndice

## LA COMPLEJA INTERACCIÓN ENTRE Chs5, ChAPs y Chs3





# The complex interactions of Chs5p, the ChAPs and the cargo Chs3p

Uli Rockenbauch\*, Alicja M. Ritz\*, Carlos Sacristan†, Cesar Roncero† and Anne Spang\*‡

\*Biozentrum, Universität Basel, Klingelbergstrasse 70, 4056 Basel, Switzerland

†Instituto de Biología Funcional y Genómica and Departamento de Microbiología y Genética, CSIC/Universidad de Salamanca, Salamanca, Spain.

‡Author for correspondence

**ABSTRACT** The exomer complex is a putative vesicle coat required for the direct transport of a subset of cargoes from the trans-Golgi network (TGN) to the plasma membrane. Exomer comprises Chs5p as well as the ChAPs family of proteins (Chs6p, Bud7p, Bch1p and Bch2p), which are thought to act as cargo receptors, and in particular Chs6p is required for the transport of the chitin synthase Chs3p to the bud neck. However, how the ChAPs associate with Chs5p and recognize cargo is not well understood. Using domain-switch chimeras of Chs6p and Bch2p we show that four tetratricopeptide repeats (TPRs) are involved in interaction with Chs5p. Since these roles are conserved between the ChAPs, the TPRs are interchangeable between different ChAP proteins. In contrast, the N-terminal and the central parts of the ChAPs contribute to cargo specificity. While the entire N-terminal domain of Chs6p is required for Chs3p export at all cell cycle stages, the central part seems to predominantly favor Chs3p export in small-budded cells. The cargo Chs3p probably also uses a complex motif for the interaction with Chs6, as the C-terminus of Chs3p interacts with Chs6p and is necessary, but not sufficient, for TGN export.

## INTRODUCTION

The trans-Golgi network (TGN) is the central sorting station for exocytic and endocytic cargoes. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, several sorting machineries and vesicular carriers operate along at least two routes to the cell surface, marked by high-density or low-density secretory vesicles (Harsay and Bretscher, 1995; Harsay and Schekman, 2002; Bard and Malhotra, 2006). Additionally, a subset of cargoes travels directly to the plasma membrane in low-density carriers, a subset of which requiring the exomer complex. This complex is a potential coat complex formed by the peripheral Golgi protein Chs5p and a protein family termed ChAPs, for “Chs5p and Arf1p binding proteins”. In budding yeast, this family includes the paralogues Chs6p, Bud7p, Bch1p, and Bch2p (Ziman et al., 1998; Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006). Chs5p and the ChAPs are recruited from the cytosol to the TGN membrane by the small GTPase Arf1p. Together, they facilitate the incorporation of specific transmembrane cargoes into secretory vesicles (Trautwein et al., 2006; Wang et al., 2006).

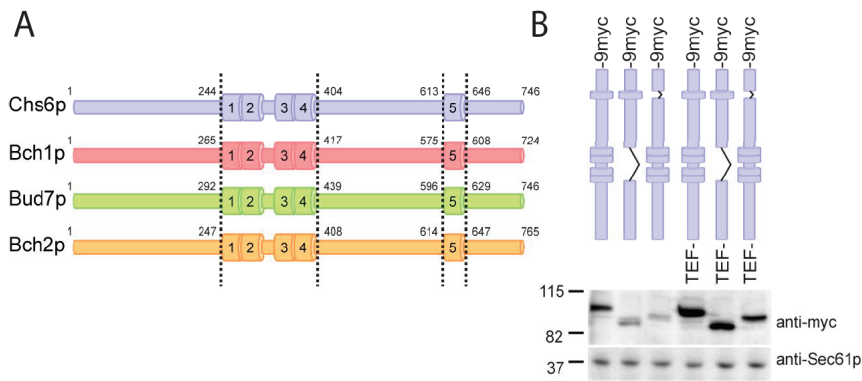
Some specialized cargoes such as chitin synthase III (Chs3p) or Fus1p depend on exomer for their transport to the cell surface (Santos and Snyder, 1997; Ziman et al., 1998; Barfield et al., 2009). However, Chs3p and Fus1p do not share a common sorting motif (Barfield et al., 2009), suggesting that the exomer complex recognizes cargoes individually, perhaps in order to allow

differential sorting. This provides an attractive model system for a protein trafficking pathway that is distinct from the major transport routes, allowing the cell to fine-tune the surface expression of cargoes depending on the cell cycle stage, or potentially also in response to the nutrient status and/or stress conditions.

The exomer components display a functional hierarchy: While individual ChAP deletions – or combinations thereof – lead to certain cellular defects, a deletion of *CHS5* collectively causes all ChAPs-associated defects (Trautwein et al., 2006). Since these phenotypes are most likely due to the inability of specific cargoes to leave the TGN, this places Chs5p functionally upstream of the ChAPs. For example,  $\Delta chs6$  cells cannot export Chs3p and thus have chitin synthesis defects, while  $\Delta bch1$  cells are sensitive to ammonium (Trautwein et al., 2006). Accordingly, cells lacking *CHS5* are both chitin-deficient and ammonium-sensitive. Interestingly, Chs3p export is also blocked when *BCH1* and *BUD7* are simultaneously deleted, suggesting that the ChAPs have partially overlapping functions. Alternatively, the ChAPs may also play a structural role in exomer complex assembly.

Chs5p requires activated Arf1p for TGN recruitment, while the ChAPs require both Chs5p and Arf1p, reflecting the functional hierarchy. The ChAPs do not co-precipitate in the absence of Chs5p, suggesting that they do not directly bind to each other (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006). How Chs5p and the ChAPs associate into a complex has not been in-

Cargo recognition by the exomer complex



**FIGURE 1: Deletion of TPRs in ChAPs only mildly affects protein expression levels (A) Domain structure of the ChAP family members. Numbers indicate the first and last amino acid of the TPR domains. The same coloring scheme is used in all subsequent figures. (B) Expression of 9myc-tagged TPR mutants of Chs6p, under the native and the TEF promoter. Immunoblot of yeast lysates; Sec61p serves as loading control. Note that all mutants were generated chromosomally.**

investigated in detail. Because of their association with distinct cargoes, it is believed that the ChAPs act as soluble receptors for transmembrane cargoes. However, their mode of cargo recognition has not been characterized.

In this study, we performed a functional analysis of the ChAP Chs6p and found that the ChAP family members contain five essential tetratricopeptide repeats (TPRs), four of which were required for binding to Chs5p and other ChAPs. Export from the TGN and bud-neck localization of the Chs6p-dependent cargo Chs3p were dependent on extended Chs6p-specific sequences outside of the TPRs, suggesting an extensive interaction between Chs3p and Chs6p. The N-terminal 244 amino acids were required for Chs3p export early and late in the cell cycle, while the central part (aa 405-612) was specifically engaged in Chs3p transport early in the cell cycle. Similarly, we found that the C-terminal part of Chs3p bound to Chs6p. Although this interaction was necessary for Chs3p export from the TGN, it was not sufficient, as transplanting the signal onto another protein did not make this protein an exomer-dependent cargo.

**RESULTS**

**The ChAPs contain tetratricopeptide repeats**

The ChAPs appear to interact directly with exomer-dependent cargoes. To gain a better understanding how cargo recognition and the interaction with other exomer components are achieved, we decided to examine the domain structure of the ChAPs. To this end, we performed a BLASTP search of the *S. cerevisiae* ChAP *CHS6* against other fungal genomes. The resulting alignment showed that particular stretches of the protein were highly conserved across species, while other sequences were more variable (Fig. S1A). We expected the more conserved stretches to correspond to domains essential for function, while the sequences with a higher degree of variation might represent parts of the protein that are not involved in functions specific to the ChAPs family. Alternatively, those variable domains could be engaged in cargo recognition, since the cargoes studied thus far, Fus1p and Chs3p, do not share obvious motifs that are commonly recognized by all ChAPs (Barfield et al., 2009).

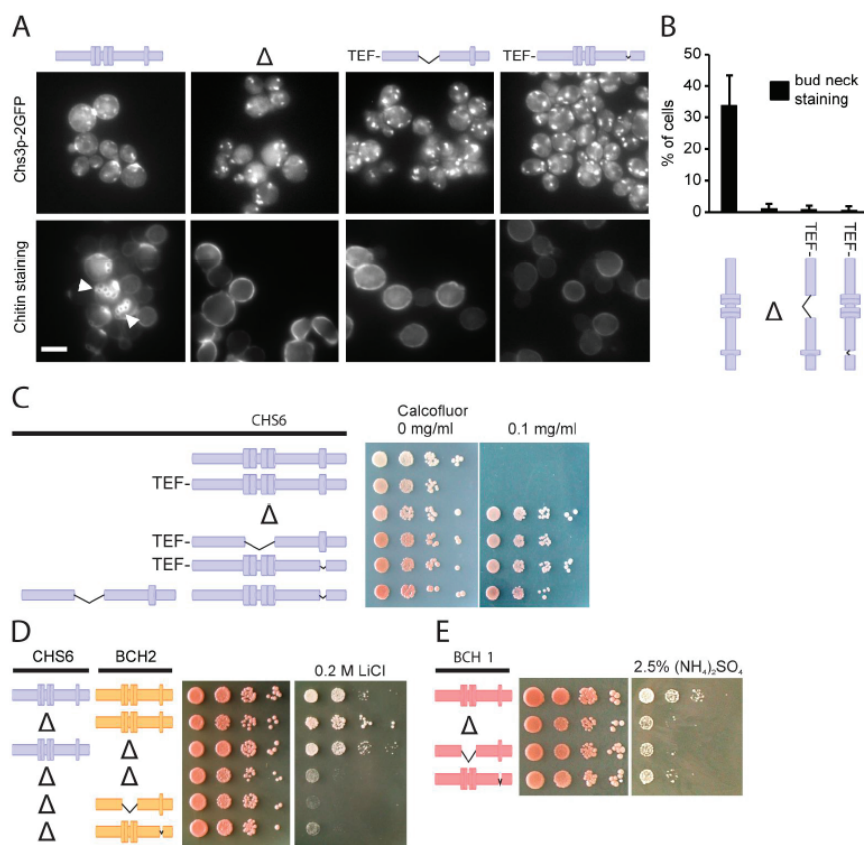
To analyze the conserved regions in more detail, we used a number of different algorithms of the Bioinformatics Toolkit (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de>) (Biegert et al., 2006). Interest-

ingly, the conserved regions contained tetratricopeptide repeats (TPRs) (Fig. 1A), four of which were clustered in the central region of Chs6p and a fifth one was located towards the C-terminus. The TPRs were conserved among the different *S. cerevisiae* ChAPs, indicating that they may represent a common feature of this protein family (Fig. 1A and Fig. S1B). This hypothesis is supported by the finding that automatic sequence annotation detected TPRs in ChAPs from *Kluyveromyces lactis*, *Ashbya gossypii*, and others (see e.g. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAG98421.1>).

TPRs are highly versatile protein-protein interaction domains. Each repeat consists of a degenerate 34 amino acid motif, which exhibits a conserved helix-turn-helix fold and the ability to form clusters of multiple repeats (Blatch and Lassle, 1999; Zhang et al., 2010). Interestingly, several cases of cargo recognition by TPRs have been described: Peroxin 5, which harbors a six-TPR tunnel recognizing the C-terminal “SKL” motif for peroxisomal import (Gatto et al., 2000); Tom20, which facilitates mitochondrial import (Abe et al., 2000), and kinesin light chain, which binds multiple cargoes via its TPR domain (Kamal et al., 2000; Hammond et al., 2008). Alternatively, TPRs can also have more structural roles, e.g. in the assembly of multiprotein complexes such as the COPI vesicle coat (Hsia and Hoelz, 2010) or the anaphase-promoting complex (APC) (Zhang et al., 2010). Thus, finding TPRs in the ChAPs family members raised the possibility that these repeats would be of functional importance for the exomer complex and could potentially provide protein-protein interaction surfaces.

**The TPRs are essential for Chs6p function**

The TPRs in the ChAPs might serve either as interaction modules for other exomer components or as cargo recognition sites. To distinguish between these possibilities, we created two internal truncations in Chs6p: The first truncation, Chs6(ΔTPR1-4), lacked the entire central cluster of TPRs. In the second construct, Chs6(ΔTPR5), the last and most conserved repeat in the protein was deleted (Fig. 1A). The mutant proteins showed only a mild reduction in expression compared to wild-type, indicating that removing one or more TPRs did not cause the protein to be largely unfolded and hence degraded (Fig. 1B). The truncations did not massively shorten the proteins. Removing TPR1-4



**FIGURE 2: The TPRs are essential for the function of the ChAPs** (A) Chs3p-2GFP localized exclusively to internal structures in  $\Delta$ *chs6*, Chs6( $\Delta$ TPR1-4) and Chs6( $\Delta$ TPR5) strains. Accordingly, while calcofluor-stained wild-type cells showed bud scar chitin staining (arrowheads), this was absent in the mutants. Scale bar: 5  $\mu$ m (B) Quantification of results in (A) Graph shows an average of three experiments. Bud neck staining was scored for the entire cell population in at least 100 cells per experiment. Bars represent standard deviation. (C) Chs6( $\Delta$ TPR1-4) and Chs6( $\Delta$ TPR5) strains were resistant to calcofluor. This defect was as pronounced as for a  $\Delta$ *chs6* strain. The two mutant alleles showed not cross-complementation. Drop tests: Plates were incubated at 30°C for 2-3 days. Blue: Chs6p alleles. “ $\Delta$ ” refers to  $\Delta$ *chs6*. (D) Bch2p requires TPRs for functionality. A *CHS6* deletion in combination with a  $\Delta$ *bch2*, Bch2( $\Delta$ TPR1-4) or Bch2( $\Delta$ TPR5) allele led to lithium-sensitivity. Drop tests were performed as above. Yellow: Bch2p alleles. “ $\Delta$ ” refers to  $\Delta$ *chs6* and  $\Delta$ *bch2*, respectively. (E) Bch1p requires TPRs for functionality. Bch1( $\Delta$ TPR1-4) and Bch1( $\Delta$ TPR5), like  $\Delta$ *bch1*, cells were sensitive to ammonium. Red: Bch1p alleles. “ $\Delta$ ” refers to  $\Delta$ *bch1*.

reduced the molecular weight by about 15 kDa, while eliminating TPR5 caused a 5 kDa reduction. In order to have consistently comparable expression levels, we decided to replace the endogenous promoter in all cases by the somewhat stronger TEF promoter (Fig. 1B).

To assess the functionality of Chs6( $\Delta$ TPR1-4) and Chs6( $\Delta$ TPR5), we monitored the localization and activity of Chs3p, whose TGN export depends on functional Chs6p. Both truncation mutants were unable to export Chs3p-2GFP from the TGN, as GFP staining was absent from the bud neck and Chs3p accumulated in intracellular structures, mimicking a *CHS6* deletion (Fig. 2A and B). Chs3p synthesizes a chitin ring around the yeast bud neck, which can be visualized by calcofluor staining (Lord et al., 2002). The chitin ring was absent in  $\Delta$ *chs6*, Chs6( $\Delta$ TPR1-4) and Chs6( $\Delta$ TPR5) (Fig. 2A, Table 1). All three mutants were calcofluor-resistant, a hallmark of chitin synthesis-defective cells (Ziman et al., 1998), demonstrating a lack of chitin synthase III activity at the plasma membrane (Fig. 2C).

The ChAPs form complexes with Chs5p in varying stoichiometries (Trautwein et al., 2006). We were therefore wondering whether the truncations, when expressed together, could cross-complement and rescue the calcofluor sensitivity. However, this was not the case, indicating that each Chs6p molecule must contain the full set of TPR motifs (Fig. 2C). In summary, these findings demonstrate that the TPRs of Chs6p are required for export of Chs3p from the TGN.

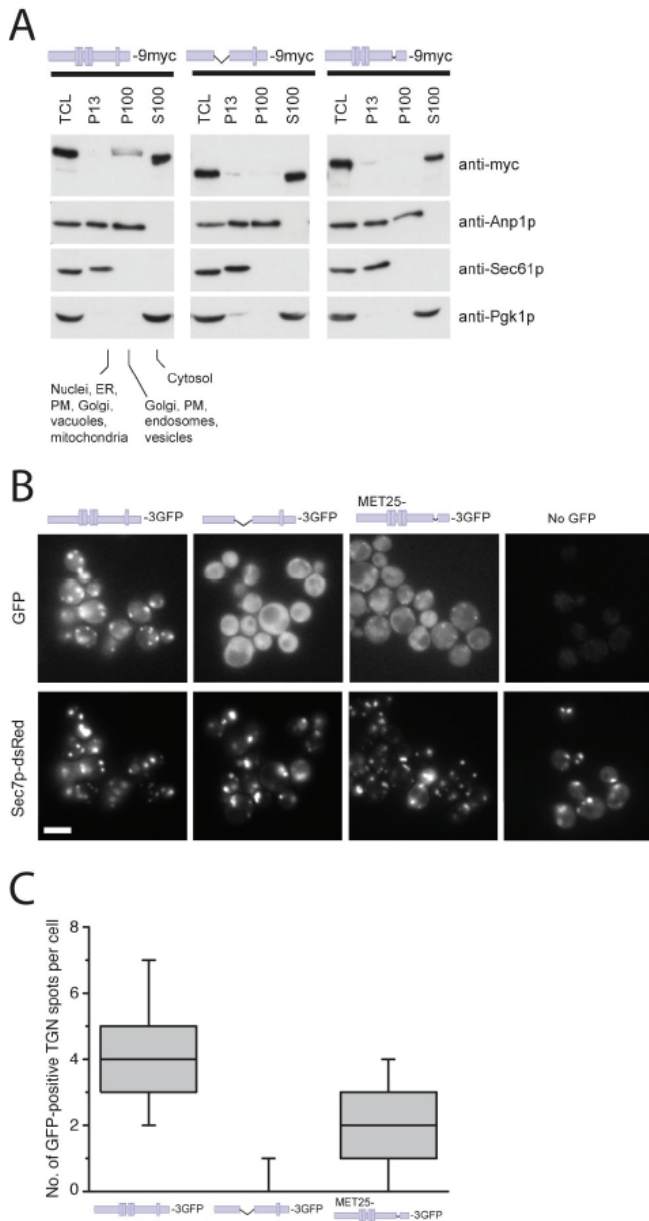
**TPR function is conserved in the ChAPs**

ChAPs share some degree of redundancy, indicated by the fact that some cellular phenotypes only arise upon deletion of multiple ChAPs (Trautwein et al., 2006; Barfield et al., 2009). For example, double deletion of *CHS6* and *BCH2* renders cells lithium-sensitive, a phenotype that could not be observed for either single deletion (Fig. 2D). This finding implicates Chs6p in the export of another – yet unidentified – cargo involved in lithium homeostasis.

We used this paradigm to test whether the TPRs in other ChAPs might be of equal importance for function. Indeed, Bch2( $\Delta$ TPR1-4 or  $\Delta$ TPR5), combined with a *CHS6* deletion, also displayed the lithium-sensitivity phenotype (Fig. 2D). Moreover, we constructed analogous truncation mutants in Bch1p and tested these for ammonium-sensitivity, which is a characteristic phenotype of  $\Delta$ *bch1* cells (Trautwein et al., 2006). Both TPR mutants behaved like the *BCH1* deletion (Fig. 2D), indicating that at least three (Chs6p, Bch2p, Bch1p) of the four ChAPs require their TPRs for functionality. Chs6p requires its TPRs for efficient Golgi recruitment

The strong defect of the TPR mutants in cargo export could be explained by either impaired recruitment of the mutant proteins to the Golgi or failure to form a productive exomer-cargo complex, or a combination of both. We therefore tested first whether the TPRs were required for Golgi association and determined the subcellular localization of the TPR mutants using differential cen-

Cargo recognition by the exomer complex



**FIGURE 3: Chs6(ΔTPR1-4) and Chs6(ΔTPR5) cannot be efficiently recruited to the Golgi (A) Chs6(ΔTPR1-4)-9myc and Chs6(ΔTPR5)-9myc display a reduced membrane association in cell lysates. Ten OD600 of cells were spheroplasted, regenerated and subsequently lysed in hypotonic buffer. Lysates were cleared of unbroken cells and subjected to differential centrifugation at 4°C. TCL, total cell lysate; P13, 13,000 g pellet; S100, 100,000 g supernatant; P100, 100,000 g pellet; PM, plasma membrane. All constructs were chromosomally expressed under the native CHS6 promoter. (B) TPR mutants show inefficient Golgi localization *in vivo*. Chs6p-3GFP and Chs6(ΔTPR1-4)-3GFP were chromosomally expressed under the native CHS6 promoter. Chs6(ΔTPR1-4)-3GFP was almost entirely cytoplasmic and showed no association with Golgi membranes. Chs6(ΔTPR5)-3GFP, expressed at a level similar to wild-type Chs6p using an inducible methionine promoter, was partially Golgilocalized (arrowheads). Scale bar: 5 μm. (C) Quantification of results in (B). Graph shows a total of 3 experiments. At least 95 cells were scored per experiment; only budded cells were used for scoring; only GFP dots overlapping with Sec7-dsRed were considered as TGN. Drawn with Origin software. Lower whisker represents 5th percentile; box represents 25th, 50th and 75th percentile; upper whisker represents 95th percentile.**

trifugation. Chs6(ΔTPR1-4)-9myc and Chs6(ΔTPR5)-9myc were depleted from the fractions containing Golgi membranes, and were found almost exclusively in the cytosol (Fig. 3A). To corroborate our findings, we also monitored the localization of the truncations by live imaging. A 3xGFP-tagged version of wild-type Chs6p mostly localized to punctate structures, which overlapped with the TGN marker Sec7p-dsRed (Fig. 3B). As previously observed, some Chs6p-3GFP was also found in the cytoplasm (Ziman et al., 1998; Trautwein et al., 2006). Consistent with the *in vitro* fractionation, *in vivo*, both Chs6(ΔTPR1-4)-3GFP and Chs6(ΔTPR5)-3GFP were not efficiently recruited to the TGN, as Chs6(ΔTPR1-4)-3GFP was found entirely in the cytoplasm, while a minor fraction of Chs6(ΔTPR5)-3GFP was present at the TGN (Fig. 3B and C). Thus, all five TPRs contribute to efficient Golgi recruitment, whereby TPRs 1-4 seem to play a more predominant role.

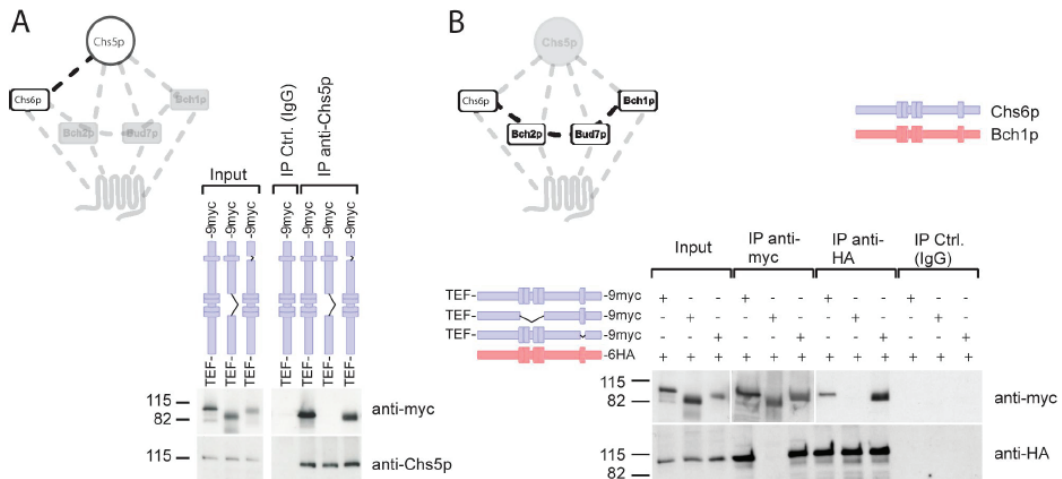
**TPR1-4 are required for interaction with Chs5p and other ChAPs**

We have shown previously that the ChAPs require Chs5p for steady state Golgi localization (Trautwein et al., 2006). Therefore, we asked next whether Chs5p interaction was also impaired in the TPR mutants, and whether this was the cause for the cytoplasmic localization of the mutants. Chs6(ΔTPR1-4) could not be co-precipitated with Chs5p (Fig. 4A), indicating that the lack of this interaction might be the cause of the cytoplasmic localization of Chs6(ΔTPR1-4). In contrast, Chs5p and Chs6(ΔTPR5) co-precipitated, suggesting that TPR5 is not involved in Chs5p binding.

Chs6p co-purifies with Bch1p in a Chs5p-dependent manner (Sanchatjate and Schekman, 2006). Thus, we expected that Chs6(ΔTPR5) would still bind to other ChAPs, while Chs6(ΔTPR1-4) would not. Alternatively, TRP5 of Chs6p could interact with the TPR5 of other ChAPs. Chs6(ΔTPR1-4), but not Chs6(ΔTPR5), specifically failed to interact with Bch1p (Fig. 4B). Similarly, Bud7p bound to Chs6(ΔTPR5) but not Chs6(ΔTPR1-4) (Fig. S2). These results suggest that the ChAPs require their first four TPRs for the association with Chs5p and thus for assembly into a complex with other exomer components.

**The TPRs are dispensable for cargo recognition**

Chs6p interacts with both Chs5p and the cargo Chs3p, and Chs5p is required for Chs6p binding to Chs3p (Trautwein et al., 2006) (Fig. 5A). Since the cargo interaction site in the ChAPs is not known and TPRs mediate protein-protein interactions, we tested whether the TPRs would be involved in this process. The binding between a cargo and its cargo recep-



**FIGURE 4: Chs6( $\Delta$ TPR1-4) fails to interact with other exomer components (A) Chs6( $\Delta$ TPR1-4) failed to bind to Chs5p, while Chs6( $\Delta$ TPR5) still interacted. Coimmunoprecipitation experiments were performed using an anti-Chs5p antibody and lysates generated from cells expressing chromosomally tagged Chs6( $\Delta$ TPR1-4)-9myc or Chs6( $\Delta$ TPR5)-9myc. (B) Chs6( $\Delta$ TPR1-4) also failed to co-precipitate with other ChAPs such as Bch1p. Blue: Chs6p alleles; red: Bch1p alleles. Two different exposures were cropped together because of the strong signal of the precipitated myc-tagged constructs.**

tor is usually rather transient (Appenzeller et al., 1999; Muniz et al., 2000; Zhang et al., 2005). To 'freeze' the interaction, we performed immunoprecipitations after chemical cross-link from yeast lysates. This approach has been used previously to detect exomer-cargo interactions (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Barfield et al., 2009). Interestingly, both TPR mutants were efficiently cross-linked to Chs3p (Fig. 5C and D), indicating that the potential to recognize cargo *in vitro* was not strongly impaired in Chs6( $\Delta$ TPR1-4) or Chs6( $\Delta$ TPR5). This result was somewhat unexpected because in the wild type situation Chs6p requires the presence of Chs5p to interact efficiently with Chs3p *in vitro* (Trautwein et al., 2006; Fig. 5D). Yet, Chs6( $\Delta$ TPR1-4) did not bind Chs5p and interacted with cargo independent of the presence of Chs5p. These findings would indicate that cargo binding and Chs5p interaction are separable in Chs6p but that Chs5p may negatively influence cargo binding by weakening the receptor-cargo interaction. To test this hypothesis, we made use of another truncation of Chs6p, in which the C-terminal 13 amino acids were deleted (Chs6( $\Delta$ C13)). This truncation fails to bind Chs5p and cannot be recruited to the Golgi apparatus (Trautwein et al., 2006). Again, like the TPR mutants, Chs6( $\Delta$ C13) still bound Chs3p (Fig. S3D). Taken together, our data suggest that Chs5p binding to Chs6p decreases the stability of Chs6p-cargo interaction.

So far we used deletions of the different TPRs. Despite the small size of the deletions, they still may change the structure of the protein and hence influence the binding. To less disturb the overall structure, we constructed a point mutant, Chs6p-L619W/G620D (LG-WD), in which two critical residues of the TPR5 backbone were mutated (Magliery and Regan, 2004) but the protein was otherwise left intact. As expected, this mutant also caused Chs3p-2GFP to accumulate in the TGN and was calcofluor-resistant (Fig. S3A-C). Again, this protein also interacted with Chs3p *in vitro* (Fig. 5C). Therefore, the results presented so

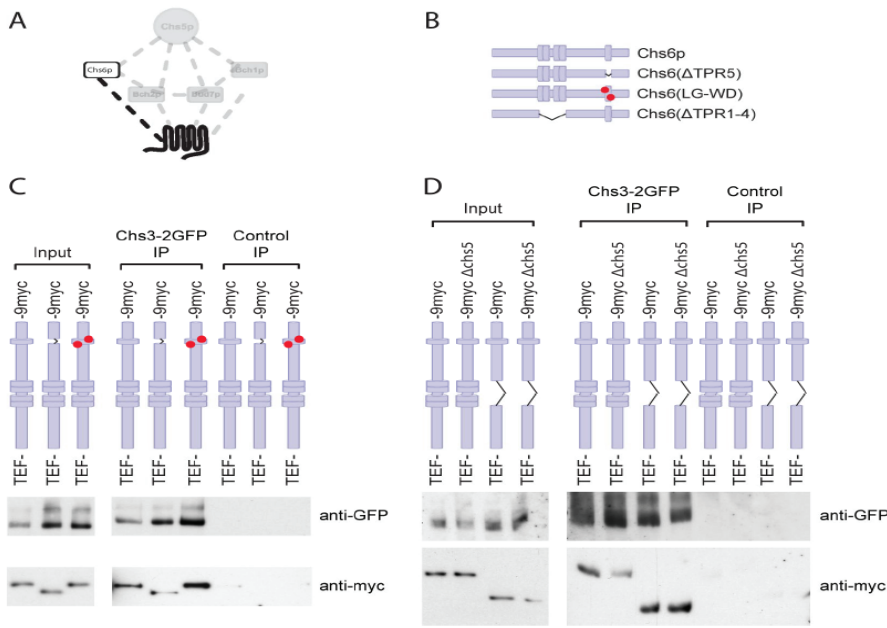
far indicate no major role of the TPRs in cargo recognition and specificity.

#### The TPRs are transplantable between the ChAPs

We have shown thus far that TPRs 1-4 are required for interaction with Chs5p and other ChAPs, and that neither TPR1-4 nor TPR5 appeared to play a major role in cargo recognition. To corroborate our results, we aimed to least disturb the structure of the protein and constructed chromosomally chimeric mutants of the ChAPs. If the TPRs would perform functions that are conserved among the ChAPs, such as Chs5p binding, they should be interchangeable between two different ChAPs, while cargo recognition would be a specific function of the ChAPs, and TPR chimeras should be non-functional in terms of cargo recognition. We chose *CHS6* and *BCH2* for these experiments because the functionality of Chs6p could be monitored easily by both Chs3p localization and chitin synthesis. Bch2p, on the other hand, is entirely dispensable for Chs3p traffic. As expected, transplantation of TPR1-4 or TPR5 from *BCH2* to *CHS6* had no effect on calcofluor sensitivity or Chs3p localization (Fig. 6), demonstrating that Chs6p chimera carrying the alien TPR1-4 or TPR5 were indeed functional. Thus, the TPRs in Chs6p are most likely not required for cargo recognition.

#### Cargo specificity of the ChAPs is not conveyed by a simple linear sequence

Since the TPRs were not involved in cargo specificity, we asked next where the cargo recognition site was located in Chs6p, and how cargo specificity was achieved. We used again our chimera approach to address these questions, and concentrated on the regions outside the TPRs (Fig. 7A, Fig. S4). First, we exchanged the central domain (CD, located between TPR4 and TPR5) of Chs6p for the CD of Bch2p. This strain did not export Chs3p from the TGN and was calcofluor-resistant, suggest-

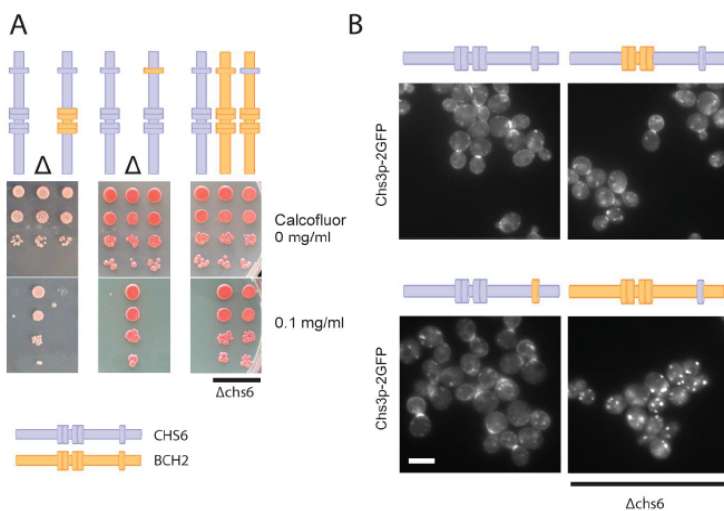


**FIGURE 5: TPRs are not required for stable association with cargo.** (A) Schematic representation of the interaction between the cargo, Chs3p, and the exomer-cargo recognition subunit, Chs6p. (B) Legend of chromosomally generated Chs6p TPR mutants. (C) Chs6(ΔTPR5) and Chs6(LG-WD) interact with cargo. To assess cargo interaction Chs3p-2GFP was precipitated from DSP-cross linked lysates with anti-GFP monoclonal antibodies and the precipitates were probed for different Chs6p constructs. Control IPs were performed using monoclonal HA antibody. Chs6(ΔTPR5) and a double TPR5 point mutant Chs6(LG-WD) retained association with Chs3p. (D) Chs6(ΔTPR1-4) interacts with Chs3p and does so independently of Chs5p, the core exomer subunit. The cross linker IP was performed as described in (B).

ing that this chimeric Chs6p was unable to recognize Chs3p as a cargo (Fig. 7B). However, the inverse experiment – transplantation of the corresponding region from *CHS6* to *BCH2* – did not change the cargo specificity of Bch2p and failed to rescue  $\Delta chs6$  defects, indicating that the central domain of the ChAPs is necessary, but not sufficient, to convey cargo specificity (Fig. 7C). Strikingly, similar results were obtained when we individually exchanged longer sequences, like the C-terminal half (aa 409-765) of Bch2p or even the N-terminus, TPR1-4 and the central domain together (aa 1-613) for the homologous sequences in Chs6p. These results were not due to a positioning effect in the genome, since insertion of the full-length *CHS6* ORF into the *BCH2* locus restored Chs3p export and calcofluor sensitivity (Fig. 7C). Moreover, the chimeric constructs were expressed and stable (data not shown). In summary, these results suggest that

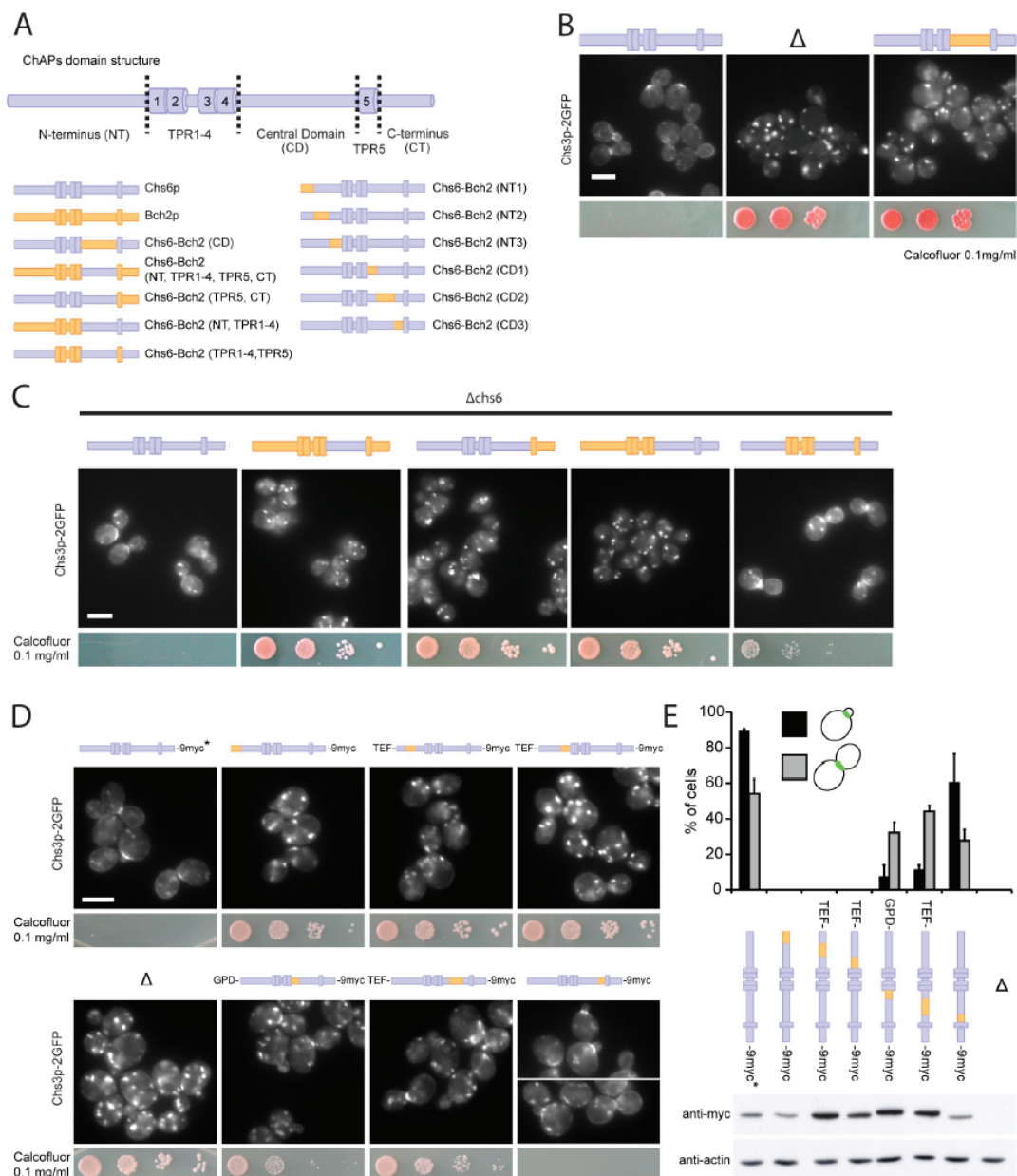
the N-terminal, central and C-terminal domain were necessary for cargo specificity, but none was sufficient by itself. In fact, only transplanting all corresponding sequences except for TPR1-4 and TPR5 restored Chs3p bud neck localization and reduced calcofluor resistance to close to wild-type levels (Fig. 7C). These data are suggestive of a model in which the TPRs would provide the interaction surface for Chs5p, while the sequences outside of these repeats may be involved in cargo recognition.

To test this hypothesis, we divided each, the N-terminus and the central domain, again into three smaller regions and replaced them individually by the corresponding sequences from Bch2p (Fig. 7A). All substitutions in the N-terminal region caused Chs3p to be in internal structures, and conferred resistance to calcofluor (Fig. 7D and E), indicating that indeed large parts of the N-terminal region of Chs6p are involved in Chs3p

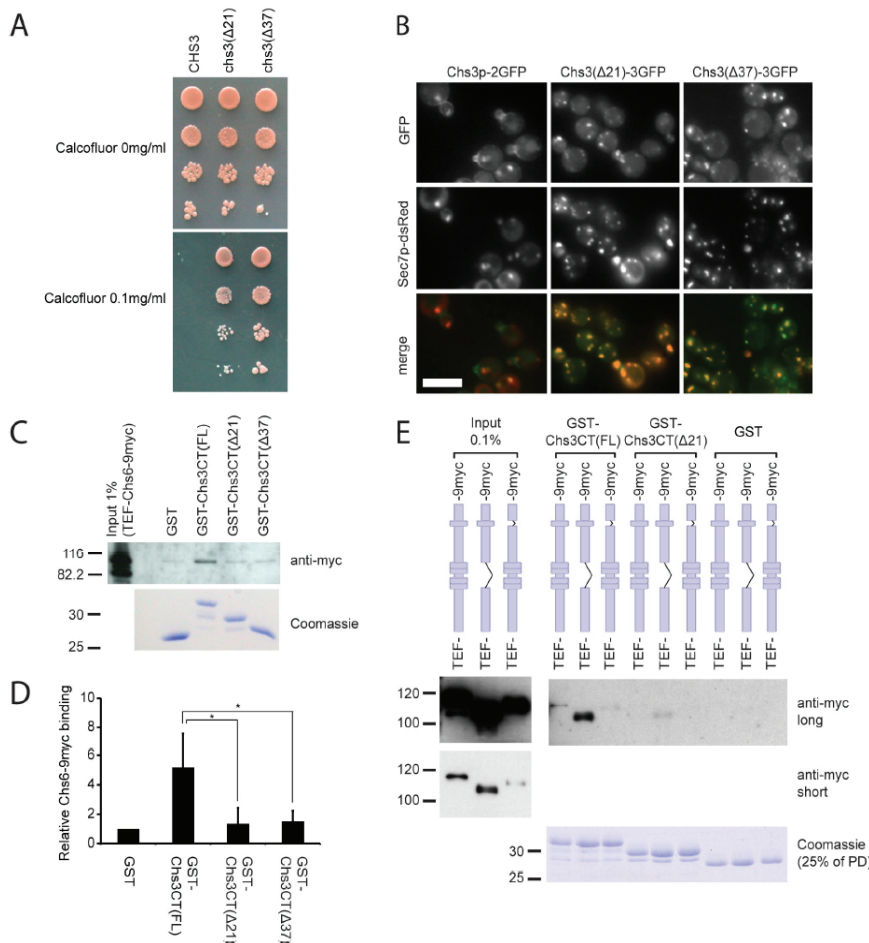


**FIGURE 6: The TPRs are interchangeable between ChAPs.** (A) Chs6p bearing either TPR1-4 or TPR5 from Bch2p is fully functional. Chimeras in which TPRs from *CHS6* were grafted into *BCH2* (or vice versa) were created by delitto perfetto. Drop tests for calcofluor sensitivity were performed as in Fig. 2. Transplanting TPR5 from Chs6p to Bch2p did not restore calcofluor sensitivity in a  $\Delta chs6$  background. Blue: Chs6p domains; yellow: Bch2p domains. "Δ" refers to  $\Delta chs6$ . (B) Live fluorescence imaging of Chs3p-2GFP in the chimeras shown in (A) confirmed that the TPRs do not contribute to cargo specificity. Scale bar: 5  $\mu$ m.





**FIGURE 7: The N-terminus, central domain and C-terminus of the ChAPs are individually necessary and only together sufficient to convey cargo specificity (A) Schematic representation of the ChAPs' domain structure and legend of Chs6p- Bch2p chromosomal chimera constructs (B) The central domain (CD) of the ChAPs is required for cargo specificity. Chimeric Chs6p bearing the CD of Bch2p was unable to export Chs3p-2GFP and rendered cells calcofluor-resistant, like a  $\Delta$ chS6 strain. Chimeras were created by delitto perfetto. Blue: Chs6p domains; yellow: Bch2p domains. "Δ" refers to  $\Delta$ chS6. Drop assays were performed as in Figure 2. Scale bar: 5  $\mu$ m. (C) The N-terminus (NT), CD and C-terminus (CT) are necessary and together sufficient to determine cargo specificity. In a  $\Delta$ chS6 background, calcofluor sensitivity was restored by re-introduction of the CHS6 full-length ORF into the BCH2 locus, but not by transplantation of the following domains from Chs6p to Bch2p: CD, NT + TPR1-4 + CD, or CD + TPR5 + CT. Transplantation of NT, CD and CT together restored Chs3p export to the bud neck (by about 82% compared to wild-type cells). Scale bar: 5  $\mu$ m. (D) Chs3p bud neck export requires the entire Chs6p N-terminal domain and the majority of the central domain, the latter only early in the cell cycle. Transplantation of short Bch2p NT fragments into Chs6p resulted in exclusive localization of Chs3-2GFP to internal structures and calcofluor resistance. Transplantation of two short Bch2p CD fragments (aa 409-464 and 465-563), but not the fragment containing aa 564-613, proximal to TPR5, resulted in severely compromised Chs3p cargo export in small-budded cells. Several chimera constructs were expressed chromosomally under the TEF or GPD promoter to achieve protein levels comparable to wild-type Chs6p. Drop assays were performed as in Figure 2. Scale bar: 5  $\mu$ m. (E) Quantification of results in (D) and expression levels of particular chimera constructs. Graph shows a total of three experiments. Bud neck staining was scored in 100 small-budded cells (G1/S phase) and 100 large budded cells (M phase) in each experiment. Bars represent standard deviation. Actin serves as a loading control in immunoblot of yeast lysates. Chs6p in wild-type control used in microscopy studies in (D) and (E) is untagged- indicated by asterisk.**



**FIGURE 8: The C-terminus of Chs3p contains an exomer-binding site required for Golgi export (A) The last 21 amino acids of Chs3p are essential for chitin synthesis. Cells expressing Chs3p lacking the C-terminal 21 or 37 amino acids were calcofluor resistant. (B) The C-terminus of Chs3p is required for Golgi export. Chromosomally generated Chs3(Δ21)-3GFP or Chs3(Δ37)-3GFP was trapped in internal membranes and co-localized with the TGN marker Sec7p-dsRed. Scale bar: 5 μm. (C) Chs6p binds to the C-terminus of Chs3p. Lysates from cells expressing Chs6p-9myc were incubated with immobilized GST, GST fused to the C-terminus of Chs3p (FL) or truncated C-terminal constructs (Δ21 and Δ37). Chs6p-9myc bound to the full C34 terminus, but binding to the truncations was abolished. (D) Quantification of results in (C). Graph shows an average of three experiments. The integrated density of Chs6-9myc bands in GST-Chs3CT pull-downs was measured using ImageJ software and normalized to that in the GST pull-down. Bars represent standard deviation. \*P<0.05 (E) Chs6(ΔTPR1-4)-9myc TPR mutant efficiently binds to the Chs3p C-terminus. GST pull-downs were performed as in (C) with lysates from cells expressing Chs6(ΔTPR1-4)-9myc or Chs6(ΔTPR5)-9myc.**

export. In contrast, we could narrow down the region in the central domain necessary for Chs3p export. The truncation in which aa 557-612 (closest to TPR5) had been swapped showed Chs3p localization similar to the wild-type control, and the strain was sensitive to calcofluor (Fig. 7D and E). Importantly, the other two chimera of the central domain mislocalized Chs3p only early in the cell cycle (Fig. 7D and E). The bud neck localization of Chs3p in large-budded cells (late in the cell cycle) was mostly achieved in these strains. Consistently, the calcofluor resistance was reduced. These data imply a general role for the Chs6p N-terminus in cargo transport, while parts of the central domain would be required only early in the cell cycle and dispensable for transport late in the cell cycle.

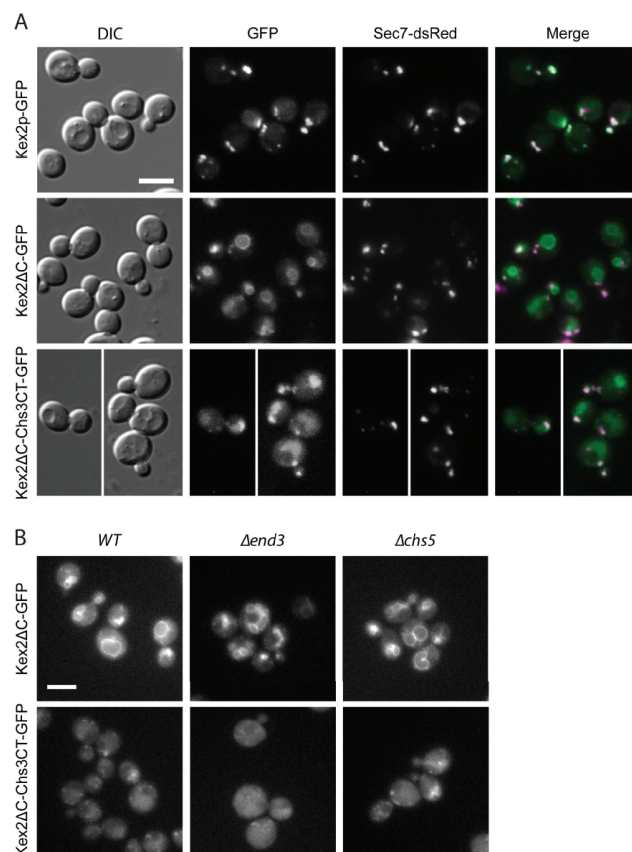
**Chs6p interacts with the C-terminus of Chs3p**

Although we could assign parts in Chs6, which were involved in cargo recognition, the size of the area - especially the N-terminal region - seemed to make it unlikely to identify a small motif that would provide the interaction site with Chs3p. On the other hand, we might be able to identify individual parts of Chs3p required for the interaction with Chs6p, similarly to the short, linear motif in Fus1p which binds to exomer (Barfield et al., 2009). Since the topology of Chs3p is still disputed (Cos et al., 1998; Meissner et al., 2010), and since even the number of transmem-

brane (TM) domains is debated – varying between four and eight – we decided to focus on the C-terminal part of Chs3p. (Cos et al. 1998) had generated two C-terminal truncations that rendered the cells calcofluor-resistant (Fig. 8A), suggesting a defect in either Chs3p function or localization. Interestingly, we found that GFP-tagged versions of these mutant proteins failed to reach the cell surface and were retained at the TGN, indicated by co-localization with Sec7p-dsRed (Fig. 8B). These results suggest that the C-terminal 21 amino acids of Chs3p might be important for binding of the exomer complex and thus for incorporation into secretory vesicles.

We therefore performed GST pull-down experiments using the C-terminal cytoplasmic tail of Chs3p, which has a total length of 55 amino acids following the last predicted TM domain. The corresponding truncation constructs lacked the final 21 and 37 amino acids, respectively. Immobilized GST fusion proteins were then incubated with whole cell lysate and analyzed for binding of Chs6p. Chs6p-9myc bound to full-length GST-Chs3CT, but not to GST alone, GST-Chs3CT(Δ21) or GST-Chs3CT(Δ37) (Fig. 8C and D). Consistently, the Chs3 tail truncations did also not bind to Chs6(TPR1-4) and Chs6(TPR5) (Fig. 8E). This result suggests that the Chs3p C-terminus contains an exomer recognition site, which is necessary for Chs6p binding *in vitro* and for Chs3p export *in vivo*. This site is likely to be located within the last 21

**FIGURE 9: (A) The C-terminus of Chs3p is not sufficient for exomer-dependent cargo export. Replacement of the cytosolic domain of Kex2p, a TGN resident protein, with the Chs3p C-terminus did not direct Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP to the plasma membrane. Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP was localized to the vacuolar lumen, whereas Kex2 $\Delta$ C-GFP localized to the vacuolar rim, indicating an influence of the Chs3p C-terminus on Kex2p sorting. Kex2-GFP, C-terminally truncated Kex2 $\Delta$ C-GFP and the Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP chimera were chromosomally expressed. Sec7-dsRed was used as a TGN marker. Scale bar: 5  $\mu$ m. (B) Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP does not traffic to the plasma membrane and its localization is exomer-independent. To assess potential trafficking through the plasma membrane, the localization of chromosomally expressed Kex2 $\Delta$ C-GFP and the Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP was assessed in a  $\Delta$ end3, endocytosis-deficient strain. Kex2 $\Delta$ C-GFP and Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP exomerdependent localization was assessed in a  $\Delta$ chs5 strain. Scale bars: 5  $\mu$ m.**



amino acids, as the  $\Delta$ 21 mutation was sufficient to abolish Chs3p transport to the cell surface and abrogate Chs6 binding.

We next tested whether the C-terminal tail would be sufficient to drive TGN export and bud neck localization of another, unrelated protein. For this, we replaced the C-terminus of the TGN/endosome localized Kex2p protease with the one of Chs3p (Fig. 9A), similar to the approach used for Fus1p (Barfield et al., 2009). The Chs3p C-terminal tail was not sufficient to cause export of Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP to the plasma membrane either in the presence or absence of Chs5p (Fig. 9). Yet, Kex2p localization was partially altered as some of it accumulated in the vacuolar lumen, an effect, which was not entirely due to the removal of the Kex2p endogenous C-terminus, as Kex2 $\Delta$ C-GFP was most predominantly found on the vacuolar rim. One possible explanation of the difference in localization of both constructs is that Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP could be exported to the plasma membrane and was then rapidly endocytosed. However, inhibiting endocytosis by the  $\Delta$ end3 mutation did not alter the localization of Kex2 $\Delta$ C-Chs3CT-GFP (Fig. 9B), indicating that this construct does not reach the plasma membrane; it might still become a substrate for the ESCRT complex and be included into the intraluminal vesicles of the late endosome. Taken together, these results suggest that although the C-terminus of Chs3p is necessary and sufficient to - albeit weakly - interact with Chs6p; it is not sufficient to drive its plasma membrane localization of another protein. Therefore, it is likely that other motifs in Chs3p exist that contact Chs6p, and that these combined interactions temporally control the export of Chs3p from the TGN.

## DISCUSSION

The late secretory pathway controls the trafficking of proteins to the cell surface and the endosomal system, but how the multitude of cargoes is correctly sorted to control their spatial and temporal localization is not well understood. In recent years, the exomer complex, comprising Chs5p and the ChAPs family, has emerged as a crucial sorting determinant for a subset of cargoes (Santos and Snyder, 1997, 2003; Trautwein et al., 2006). However, little is known about how exomer assembles at the TGN and recognizes specific cargo proteins. To gain insight into the exomer function and cargo interaction, we performed a structure-

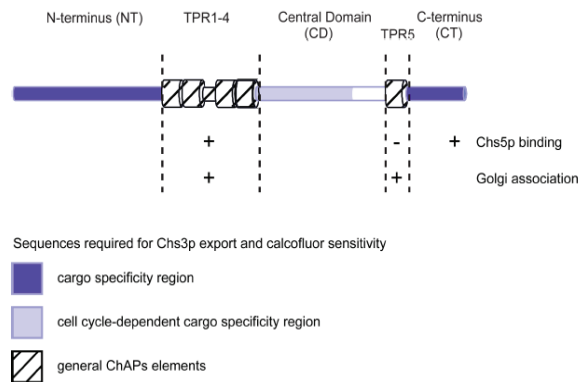
function analysis of the ChAP Chs6p. We chose Chs6p because it has one well-established cargo, the chitin synthase Chs3p, and is required for proper Chs3p localization at the bud neck early and late in the cell cycle (Zanolari et al., 2011).

The search for conserved structural motifs yielded a cluster of four TPRs in the center and one TPR towards to the C-terminus of all ChAPs. TPR1-4 were required for interaction with Chs5p and other ChAPs, as well as localization to the Golgi, probably through the interaction with Chs5p. In contrast, the 5th TPR, which is the most conserved one by sequence between the ChAPs, does probably not interact with Chs5p or other ChAPs directly, and is not actively involved in cargo recognition. However, this TPR is still necessary for efficient Golgi-recruitment. As at least three TPRs appear to be necessary for biological relevant functions i.e. to serve as protein-protein interaction scaffolds (D'Andrea and Regan, 2003; Zeytuni and Zarivach, 2012), it is conceivable that the single TPR5 would contact TPR1-4. In this scenario, either TPR5 itself or a then exposed sequence would interact with a thus far unknown factor at the Golgi to stabilize ChAPs' TGN localization.

Interestingly, deletions in either TPR1-4 or TPR5 were still able to interact with Chs3p in an *in vitro* cross-linking approach indicating that in both cases the ability of cargo recognition was maintained, and that the lack of steady state localization of these truncations to the TGN was the reason for the defect in exporting Chs3p to the plasma membrane. Intriguingly, Chs6 $\Delta$ TPR1-4 was reproducibly more efficiently cross-linked to Chs3p than

wild-type Chs6p *in vitro*, even in the absence of Chs5p. Since TPR1-4 are essential for the interaction with Chs5p, it is tempting to speculate that Chs5p, and potentially other ChAPs, may regulate the binding affinity of the Chs6p to the cargo. The affinity of the cargo and its receptor needs to be relatively low to allow readily dissociation of the cargo.receptor complex after either inclusion into the transport carrier or upon release at the target compartment. Although, we cannot exclude a regulatory role of the TPRs in cargo binding, they are dispensable for cargo specificity: transplanting TPRs from Bch2p, which has no role in Chs3p trafficking, did not cause mislocalization of Chs3p, hence excluding a function in specific cargo recognition. This was a bit surprising at first because TPRs interact with their ligands through a combination of factors, such as hydrophobic pockets, residue type, charge and electrostatics (Zeytuni and Zarivach, 2012), and we assumed that these repeats were uniquely suited to recognize a variety of cargoes that do not share sequence homology and are structurally very different such as Chs3p and Fus1p. Instead, we find that cargo specificity and recognition is located outside the TPRs, and is most likely rather complex (Fig. 10). Our data indicate that Chs6p-specific sequences from the N-terminus, the central domain, and the C- terminus are involved in the spatial and temporal control of Chs3p localization. In an attempt to narrow down these allegedly large areas, we found that among the N- terminal 246 amino acids there must be many residues, which are required for Chs3p export form the TGN and which do not form a short linear motif. This analysis made it essentially impossible to go on to define a specific motif that would comprise the Chs3p binding pocket because our chimera analysis would rather suggest that the folding of the N-terminus would provide a platform or binding pocket for at least part of Chs3p.

Although replacing the entire central domain of Chs6p by Bch2p sequences caused Chs6p to be non functional in terms of Chs3p transport, systematic replacement of parts of the central domain revealed that amino acids 409-563, which are located just downstream of TPR1-4, have a cell cycle specific role in Chs3p export; they are only required early in the cell cycle. This finding is consistent with the notion that traffic of Chs3p is differentially regulated in the cell cycle (Zanolari et al., 2011). Thus, Chs3p may also contact the central domain of Chs6p for transport. The cell cycle specific requirements may be due to the post-translational modifications known to occur in Chs3p (Peng et al., 2003; Valdivia and Schekman, 2003; Lam et al., 2006), some of which could be cell cycle-dependent. Alternatively, accessory proteins might specifically control the formation of the exomer-Chs3p complex at the TGN in a cell cycle-dependent manner. The reason we favor a second interaction site for Chs3p in the central domain is based on the findings that first replacing the entire central domain by Bch2p, inhibits Chs3p export from the TGN throughout the cell cycle and second the N-terminus of Chs6p is not sufficient to drive export of Chs3p from the TGN. Our data indicate that there is even a third interaction site in the C-terminal region of Chs6p as we need to transplant sequences from all three regions outside of the TPRs for efficient



**FIGURE 10: Summary scheme of Chs6p domains and their function in regard to cargo-specific interaction, interaction with Chs5p, the core exomer subunit, and TGN recruitment.**

transport of Chs3p to the bud neck. In principle, our data would be consistent with two models: the first one would suggest the presence of three individual binding sites/surfaces for Chs3p, each of which would be necessary but not sufficient. Alternatively, at least two if not all three regions would come together in the folded 3D molecule and present one or two large interaction surfaces. At this point, we cannot distinguish between these two possibilities. However, we can exclude that a simple binding pocket provided by Chs6p and which would bind one particular sequence of Chs3p, would be sufficient for productive complex formation causing Chs3p plasma membrane localization. We identified a sequence in the C-terminus of Chs3p required for its TGN export, which bound weakly but specifically to Chs6p. Still, this sequence was not sufficient to cause an unrelated protein to become an exomer substrate or to be plasma membrane localized. The idea that the ChAPs do not just require a simple, linear sequence was already suggested by Barfield et al. (2009), who found that a necessary exomer-interaction sequence was not sufficient to transform a non-exomer cargo into an exomer-dependent cargo. Yet, in this case the interpretation was complicated by the simultaneous requirement of two different ChAPs for the transport of Fus1p. Moreover, the Fus1p motif is not contained in Chs3p, and the Chs3p tail is not matched by a homologous sequence in Fus1p. In this study, we could extend this notion to a more complex interaction mode between the ChAPs and their cargo. We showed that large interaction surface(s) and multiple sequences on both the cargo receptor and the cargo are required cargo export through the exomer-dependent pathway.

Why would have the ChAPs evolved to recognize complex trafficking motifs? One could speculate that similar to the Sec23/24 complex of the COPII coat at the ER a multitude of cargoes has to be transported (Kuehn and Schekman, 1997; Kurihara et al., 2000; Miller et al., 2002; Miller et al., 2003) and therefore large interaction surface or multiple binding sites might be useful. However, the exomer-dependent transport route is not the major export pathway from the TGN. In fact, only 2 clients for the exomer route have been identified to date (Sancharjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006; Barfield et al., 2009)

Thus, the purpose might be a different one: Chs3p and Fus1p are both proteins that require temporal and spatial regulation of their transport. Therefore, exomer-dependent cargoes may have a very specific role at the plasma membrane that would require a relative tight control of discharge at the plasma membrane and subsequent endocytosis. At least Chs3p requires endocytic recycling for proper bud neck localization (Reyes et al., 2007; Sacristan et al., 2012). However, N=1 is obviously a too tiny data set to draw general conclusions. Therefore the identification and characterization of other exomer-dependent cargoes will shed more light on the function and selectivity of the exomer complex.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and growth conditions

Yeast strains used in this study are listed in Table S1. Standard yeast media were prepared as described (Sherman, 1991). Calcofluor plates were based on minimal medium containing additionally 0.1% yeast extract, 1% MES buffer pH 6.0 and 0.1 mg/ml Calcofluor White (Sigma).

### Yeast genetic methods

Standard genetic techniques were used throughout (Sherman, 1991). Chromosomal tagging and deletions were performed as described (Knop et al., 1999; Gueldener et al., 2002). For C-terminal tagging with 3xGFP, the plasmid pYM-3GFP was used (Zanolari et al., 2011). All PCR-based chromosomal manipulations were confirmed by analytical colony PCR. The Sec7p-dsRed plasmid (pTPQ128) was described previously (Proszynski et al., 2005). Marker-free chromosomal deletions were performed using the delitto perfetto method (Storici and Resnick, 2006) and confirmed by sequencing. Genetic chimeras were constructed using a modified version of the same technique: After insertion of the CORE cassette, the desired foreign genetic element was amplified from genomic DNA using chimeric primers, which were homologous to the 45 base pairs upstream and downstream of the delitto perfetto site. This PCR product was then directly used for transformation, thus recombining with the locus and replacing the CORE cassette.

### Western Blot detection

Epitope tags and proteins were detected using the following antibodies: anti-myc (Sigma 9E10 1:1,000); anti-HA (Eurogentec HA11 1:1,000); anti-FLAG (Sigma M2 1:1,000); anti-Chs5p (affinity-purified, 1:500); anti-Chs3p (affinity-purified, 1:1,000); anti-GFP (Torrey Pines Biolabs 1:5,000 or Roche anti-GFP 7.1 and 13.1 1:500); anti-Pgk1 (Invitrogen #A-6457 1:1,000), anti-Anp1p (a gift from S. Munro, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, 1:1000 working solution supplemented with extract from  $\Delta$ anp1 yeast cells) and anti-Sec61p serum (a gift from Prof. M. Spiess, Biozentrum Basel, 1:10,000). ECL (GE Healthcare) was used for detection. For myc epitope detection in cross linker immunoprecipitation experiments and GST pull-downs, anti-myc 9E10 (Sigma, 1:4,000) and TrueBlot-anti-mouse-HRP secondary antibody (eBioscience, 1:2,500) were employed, and ECL Advance (GE Healthcare) was used for detection according to the manufacturer's instructions.

### Microscopy

Cells were grown to log phase in rich or selective medium supplemented with adenine, then harvested, washed and mounted. Images were acquired with an Axiocam mounted on a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope, using filters for GFP, dsRed or DAPI. Chitin staining was carried out as described (Lord et al., 2002). Briefly, cells grown for at least 16 h to late log phase were stained after formaldehyde fixation in 1 mg/ml calcofluor, washed 3x in water and imaged directly.

### Subcellular fractionation

Ten OD<sub>600</sub> of mid-log cells were incubated in 1 ml DTT buffer (10 mM Tris pH 9.4, 10 mM DTT) for 5 min at 30°C, spun down and resuspended in 1 ml SP-buffer (75% YP, 0.7 M sorbitol, 0.5% glucose, 10 mM Tris pH 7.5). Thirty  $\mu$ l of zymolyase T20 (10 mg/ml) were added and the cells spheroplasted at 30°C for 40 min. Cells were washed once in zymolyase-free SP buffer, resuspended in the same buffer and incubated at 30°C for 30 min. Regenerated cells were gently spun down and lysed in 1 ml 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA, 50 mM NaCl and protease inhibitors by pipetting up and down. The lysate was cleared at 500 g for 2 min and the supernatant (= "total cell lysate", TCL) subjected to centrifugation at 13,000 g (10 min). The supernatant (S13) was carefully taken off with a pipette and subjected to centrifugation at 100,000 g (1 h). Both pellets (P13 and P100) were rinsed with lysis buffer and then resuspended in 1 ml lysis buffer. All steps were carried out at 4°C. Samples were taken from all final fractions and subjected to immunoblot analysis.

### Co-immunoprecipitation

Yeast lysates from 10 OD<sub>600</sub> of cells were prepared by spheroplasting as described above. Spheroplasts were sedimented (2 min, 1,000 g), lysed in B150Tw20 buffer (20 mM HEPES, pH 6.8, 150 mM KAc, 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>, 1% Tween-20) with protease inhibitors and cleared by centrifugation (10 min, 16,000 g). Immunoprecipitations were performed with 5  $\mu$ g affinity purified rabbit IgG (Dianova), 5  $\mu$ g affinity-purified anti-Chs5p antibody, 5  $\mu$ g anti-HA (HA.11, Eurogentec), 5  $\mu$ g anti-myc (9E10, Sigma) or 5  $\mu$ g anti-AU5 (Abcam) and 100  $\mu$ l 20% Protein A sepharose per 1 ml cleared lysate for 1 h at 4°C. The beads were washed, resuspended in sample buffer, and bound proteins analyzed by immunoblot.

### Cross linker immunoprecipitation

For each sample, 10 OD<sub>600</sub> of yeast cells were resuspended in 220  $\mu$ l B88 buffer (20 mM HEPES, pH 6.8, 150 mM KAc, 5 mM Mg(Ac)<sub>2</sub>, 250 mM sorbitol) with protease inhibitors and subjected to FastPrep lysis (MP Biomedicals, Illkrich, France). The lysate was cleared by centrifugation at 13,000 g for 5 min at 4°C. DSP (Pierce; 2 mM final concentration) dissolved in DMSO was added to 140  $\mu$ l lysate. The cross linking reaction took place for 30 min at RT and was stopped with 7  $\mu$ l 1 M Tris (pH 7.5) for 15 min. Then, 8  $\mu$ l 20% SDS were added, and the sample was incubated at 65°C for 15 min. 1.35 ml IP buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% TX-100, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l BSA) were added, and the

Cargo recognition by the exomer complex

sample was centrifuged for 10 min at 16,000 g. The supernatant was subjected to immunoprecipitation over night at 4°C using 5 µg monoclonal anti-GFP antibody (clones 7.1 and 13.1, Roche) cross-linked to Protein A sepharose with DMP (Pierce). Control immunoprecipitations with 5 µg monoclonal anti-HA antibody (HA.11 clone 16B12, Covance) were performed in parallel. Precipitates were washed once in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% TX-100, 0.1% SDS and twice in the same buffer containing 250 mM NaCl. Precipitates were resuspended in 50mM Tris/HCl pH 7.5, 250 mM NaCl and transferred into new tubes. The washed precipitates were incubated at 95°C for 30 min in SDS sample buffer containing 100 mM DTT and analyzed by immunoblot. Alternatively extracts were prepared by bead lysis and immunoprecipitations were performed with 5 µg affinity-purified anti-Chs3p antibody.

### BLAST analysis and TPR prediction

The Chs6p primary protein sequence was subjected to fungal BLAST search (available on *Saccharomyces* Genome Database, [www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) using the default settings of the BLASTP algorithm on all available fungal nuclear genomes, excluding *Saccharomyces cerevisiae*. TPRs were predicted with the TPRPRED algorithm (Karpenahalli et al., 2007), using the standard settings.

### GST Pull-downs

The C-terminal full-length tail of Chs3p or C-terminally truncated versions ("Δ21" and "Δ37") were cloned into pGEX-6P-1 using EcoRI and XhoI restriction sites. The full-length tail comprised the last 55 amino acids (aa) following the last predicted transmembrane (TM) domain, while truncations of this tail lacked the C-terminal 21 and 37 aa, respectively. Expression in Rosetta *E. coli* cells was induced by addition of 1 mM IPTG and growth in LB medium at 37°C for 4 h. Cells were lysed in PBS/5% glycerol, and GST fusions were purified with GSH agarose (Sigma), eluted with 40 mM GSH and dialyzed against PBS/5% glycerol.

GST and GST-tagged Chs3p C-terminus were bound to GSH agarose. For each sample, 10 OD600 of yeast cells were resuspended in 250 µl B88 buffer with protease inhibitors and subjected to bead lysis or resuspended in 220 µl B88 buffer and subjected to fast prep lysis. Yeast lysates were diluted six times in B150Tw20 to a final protein concentration of approx. 0.5 µg/µl. The lysates were incubated with the coupled resin for 1 h at 4°C. Beads were washed twice with B150Tw20 buffer, once with B150Tw20 buffer supplemented with 150 mM NaCl and then resuspended in 40µl SDS sample buffer, followed by incubation at 95°C for 10 min. Bound proteins were analyzed by immunoblot. For quantification of Chs6-9myc binding to full-length or truncated C-terminal Chs3p tails images of scanned blots were inverted, and intensity values were determined for each band using ImageJ by drawing a box of fixed size around each band and using the "integrated density" function. Each band was background-corrected against the intensity value of the gel lane (below the band). Absolute values were then normalized relative to GST.

### ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to B. Zanolari and M. Trautwein for their initial observation of the lithium-sensitivity phenotype, and to M. Spiess and S. Munro for the anti-Sec61p and anti-Anp1p serum, respectively. We would also like to thank all members of the Spang lab for technical advice and helpful discussion. This work was supported by a graduate student fellowship of the Werner Siemens Foundation to U.R., the University of Basel (A.S.) and the Swiss National Science Foundation (A.S.).

### REFERENCES

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., and Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.
- Appenzeller, C., Andersson, H., Kappeler, F., and Hauri, H.P. (1999). The lectin ERGIC-53 is a cargo transport receptor for glycoproteins. *Nat Cell Biol* 1, 330-334.
- Bard, F., and Malhotra, V. (2006). The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 439-455.
- Barfield, R.M., Fromme, J.C., and Schekman, R. (2009). The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell* 20, 4985-4996.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Soding, J., and Lupas, A.N. (2006). The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Res* 34, W335-339.
- Blatch, G.L., and Lassle, M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21, 932-939.
- Cos, T., Ford, R.A., Trilla, J.A., Duran, A., Cabib, E., and Roncero, C. (1998). Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* 256, 419-426.
- D'Andrea, L.D., and Regan, L. (2003). TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28, 655-662.
- Gatto, G.J., Jr., Geisbrecht, B.V., Gould, S.J., and Berg, J.M. (2000). Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol* 7, 1091-1095.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D., and Hegemann, J.H. (2002). A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 30, e23.
- Hammond, J.W., Griffin, K., Jih, G.T., Stuckey, J., and Verhey, K.J. (2008). Cooperative versus independent transport of different cargoes by Kinesin-1. *Traffic* 9,725-741.
- Harsay, E., and Bretscher, A. (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* 131, 297-310.
- Harsay, E., and Schekman, R. (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* 156, 271-285.
- Hsia, K.C., and Hoelz, A. (2010). Crystal structure of alpha-COP in complex with epsilon-COP provides insight into the architecture of the COPI vesicular coat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 11271-11276.
- Kamal, A., Stokin, G.B., Yang, Z., Xia, C.H., and Goldstein, L.S. (2000). Axonal transport of amyloid precursor protein is mediated by direct binding to the kinesin light chain subunit of kinesin-I. *Neuron* 28, 449-459.
- Karpenahalli, M.R., Lupas, A.N., and Soding, J. (2007). TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8,2.

- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., and Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Kuehn, M.J., and Schekman, R. (1997). COPII and secretory cargo capture into transport vesicles. *Curr Opin Cell Biol* 9, 477-483.
- Kurihara, T., Hamamoto, S., Gimeno, R.E., Kaiser, C.A., Schekman, R., and Yoshihisa, T. (2000). Sec24p and Iss1p function interchangeably in transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 11, 983-998.
- Lam, K.K., Davey, M., Sun, B., Roth, A.F., Davis, N.G., and Conibear, E. (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol* 174, 19-25.
- Lord, M., Chen, T., Fujita, A., and Chant, J. (2002). Analysis of budding patterns. *Methods Enzymol* 350, 131-141.
- Magliery, T.J., and Regan, L. (2004). Beyond consensus: statistical free energies reveal hidden interactions in the design of a TPR motif. *J Mol Biol* 343, 731-745.
- Meissner, D., Odman-Naresh, J., Vogelpohl, I., and Merzendorfer, H. (2010). A novel role of the yeast CaaX protease Ste24 in chitin synthesis. *Mol Biol Cell* 21, 2425-2433.
- Miller, E., Antonny, B., Hamamoto, S., and Schekman, R. (2002). Cargo selection into COPII vesicles is driven by the Sec24p subunit. *EMBO J* 21, 6105-6113.
- Miller, E.A., Beilharz, T.H., Malkus, P.N., Lee, M.C., Hamamoto, S., Orci, L., and 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.
- Muniz, M., Nuoffer, C., Hauri, H.P., and Riezman, H. (2000). The Emp24 complex recruits a specific cargo molecule into endoplasmic reticulum-derived vesicles. *J Cell Biol* 148, 925-930.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21, 921-926.
- Proszynski, T.J., Klemm, R.W., Gravert, M., Hsu, P.P., Gloor, Y., Wagner, J., Kozak, K., Grabner, H., Walzer, K., Bagnat, M., Simons, K., and Walch-Solimena, C. (2005). A genome-wide visual screen reveals a role for sphingolipids and ergosterol in cell surface delivery in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 17981-17986.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A., and Roncero, C. (2007). Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J Cell Sci* 120, 1998-2009.
- Sacristan, C., Reyes, A., and Roncero, C. (2012). Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol Microbiol* 83, 1124-1135.
- Sanchatjate, S., and Schekman, R. (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol Biol Cell* 17, 4157-4166.
- Santos, B., and Snyder, M. (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* 136, 95-110.
- Santos, B., and Snyder, M. (2003). Specific protein targeting during cell differentiation: polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2, 821-825.
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 194, 3-21.
- Storici, F., and Resnick, M.A. (2006). The *delitto perfetto* approach to *in vivo* site-directed mutagenesis and chromosome rearrangements with synthetic oligonucleotides in yeast. *Methods Enzymol* 409, 329-345.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gauss, R., Dengjel, J., Hartmann, E., and Spang, A. (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *Embo J* 25, 943-954.
- Valdivia, R.H., and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10287-10292.
- Wang, C.W., Hamamoto, S., Orci, L., and Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol* 174, 973-983.
- Zanolari, B., Rockenbauch, U., Trautwein, M., Clay, L., Barral, Y., and Spang, A. (2011). Transport to the plasma membrane is regulated differently early and late in the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 124, 1055-1066.
- Zeytuni, N., and Zarivach, R. (2012). Structural and functional discussion of the tetra-trico-peptide repeat, a protein interaction module. *Structure (London, England : 1993)* 20, 397-405.
- Zhang, B., Kaufman, R.J., and Ginsburg, D. (2005). LMAN1 and MCFD2 form a cargo receptor complex and interact with coagulation factor VIII in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 280, 25881-25886.
- Zhang, Z., Kulkarni, K., Hanrahan, S.J., Thompson, A.J., and Barford, D. (2010). The APC/C subunit Cdc16/Cut9 is a contiguous tetratricopeptide repeat superhelix with a homo-dimer interface similar to Cdc27. *Embo J* 29, 3733-3744.
- Ziman, M., Chuang, J.S., Tsung, M., Hamamoto, S., and Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 9, 1565-1576.





# Material Suplementario

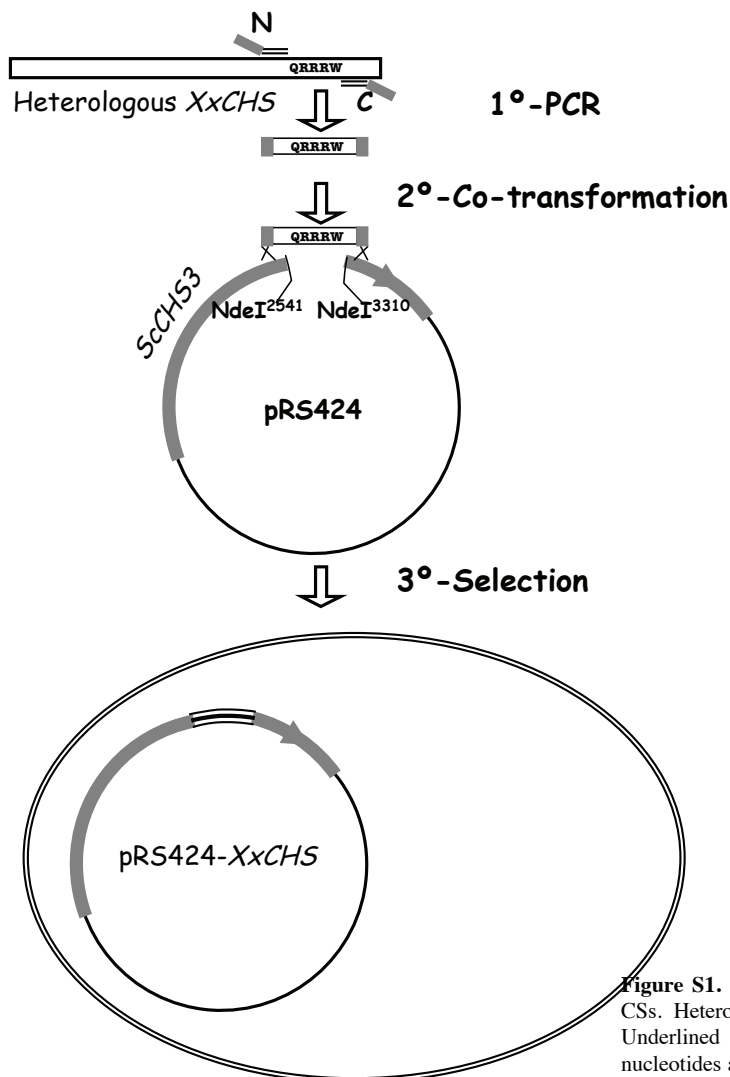


# Material Suplementario Capítulo 1

## CARACTERIZACIÓN DE QUITÍN SINTASAS DE LA FAMILIA 2 DE DISTINTOS HONGOS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

**Table S1.** Pair-wise comparison of the CSs from classes IV and V after Clustal W alignment.

	Sc3	Ca3	AfF	Cn1	Cn3	AfE	Cn6
ScChs3p (IV)	100						
CaChs3p (IV)	83.5	100					
AfChsFp (IV)	74.2	77.5	100				
CnChs1p (IV)	62.9	61.1	66.6	100			
CnChs3p (IV)	69.4	71.7	77.2	64.3	100		
AfChsEp (V)	48.7	49.7	48.4	50.0	48.0	100	
CnChs6p (V)	45.3	45.0	48.2	51.8	45.0	66.7	100



### CaCHS3

- CaCHS3-N  
ATAACATTTGATGAAAGAATGACTCAATTGGAATTCAGCTTTTAAAAAATAGTATTTGGAGAATCACC  
- CaCHS3-C  
TGAGTGATCAAATTCACCTTCATTCTCGTCTTGCCCTTTTATTACCTCCAGCAACTGTCTTGTTTCACC

### AfCHSF

- AfCHSF-N  
GGTAAGCGTGATTCTCAAATATTCTGATGTCCTTTTGTAGAAAAATAACAATTCGACGAGAGAATGACAG  
- AfCHSF-C  
CTCGTCTTGCCCTTTTATTACCTCCCGCAATAGTTCTCGTATCTCCCAGCTGAAGTCGTC

### CnCHS3

- CnCHS3-N  
GGTAAGCGTGATTCTCAAATATTCTGATGTCCTTTTGTAGAAAAATAACAATTCGATGAGCGAATGACT  
- CnCHS3-C  
CTTTGAGTGATCAAATTCACCTTCATTCTCGTCTTGCCCTTTTATTACCTCCAGCAATTTTTCGGGT

### CnCHS1

- CnCHS1-N  
GGCAGATTACGGGCTAATGGCAGACTTCTACGAAACGGTACTTATGGTTGATGCAGATACCCGAATTTAC  
- CnCHS1-C  
CTTCATTTCTGCTTTTGCCCTTTTATTACCTCCCGCAATAGTTCTCGTATCACCCATGAAAAATCATCAAA

### FoCHSV Large

- FoCHSVL-N  
CAATTGTGAAGTCCGGTACTCCTCGAGAGAGGGGGCCGCAAAACCCGGTAACCGTGGTAAAGC  
- FoCHSVL-C  
CTCGTCTTGCCCTTTTATTACCTCCCGCAATAGTTCTCGTATCACCCAGTTGAAGTCATC

### FoCHSV Small

- FoCHSVS-N  
CATCATCAGGCTAAAGCTTTGAATCTGTCTCGGTTCCGTAACCTGTTTGCCTGGTGTCTCTCTATGTAC  
- FoCHSVS-C  
CATGGAAAAACAGAAAGTCCACATAAGTCTCTGATTAGAACTAATTCAAAAAGATTGTGCACAGTAGAGTTGAT

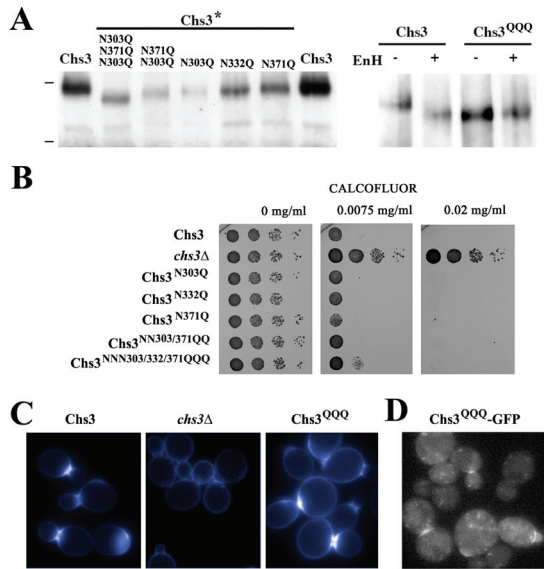
### AfCHSE Small

- AfCHSE-N  
CATCATCAGGCTAAAGCTTTGAATCTGTCTCGGTTCCGTAACCTGTTTGCCTGGATGTTTCACGATG  
- AfCHSE-C  
CATGGAAAAACAGAAAGTCCACATAAGTCTCTGATTAGAACTAATTCAAAAAGATTGTGCACAGTAGAGTTGAT

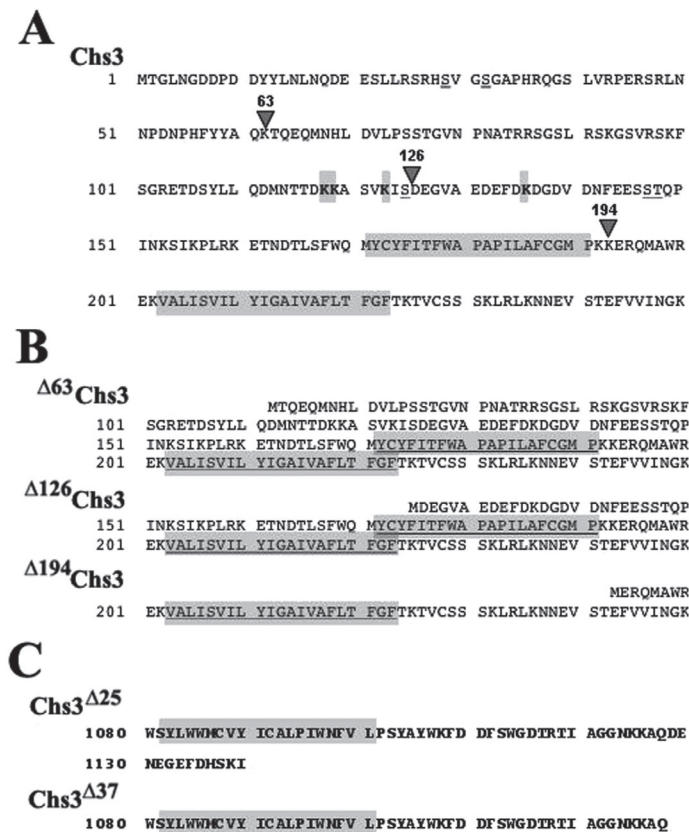
**Figure S1.** Schematic representation of the steps followed for the construction of the chimaeric CSs. Heterologous DNAs were amplified by the mixed oligonucleotides shown in the table. Underlined regions hybridized to the different heterologous *CHS* genes, while the remained nucleotides are homologous to *ScCHS3* regions (grey bars in the figure), directing the homologous recombination in vivo. The pRS424-*ScCHS3* was linearized with *NdeI* as indicated or with *KpnI* for the small fragments (not shown)

# Material Suplementario Capítulo 2

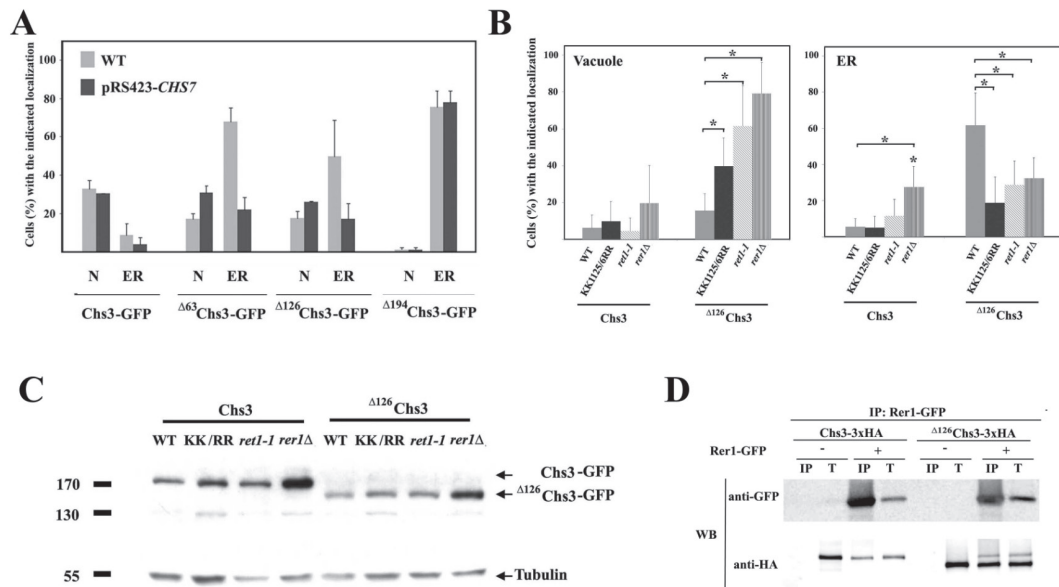
## EL CONTROL DE LA DIMERIZACIÓN DE CHS3 EN EL APARATO DE GOLGI Y SU FUNCIÓN EN EL RECICLAJE ENDOCÍTICO DE LA PROTEÍNA



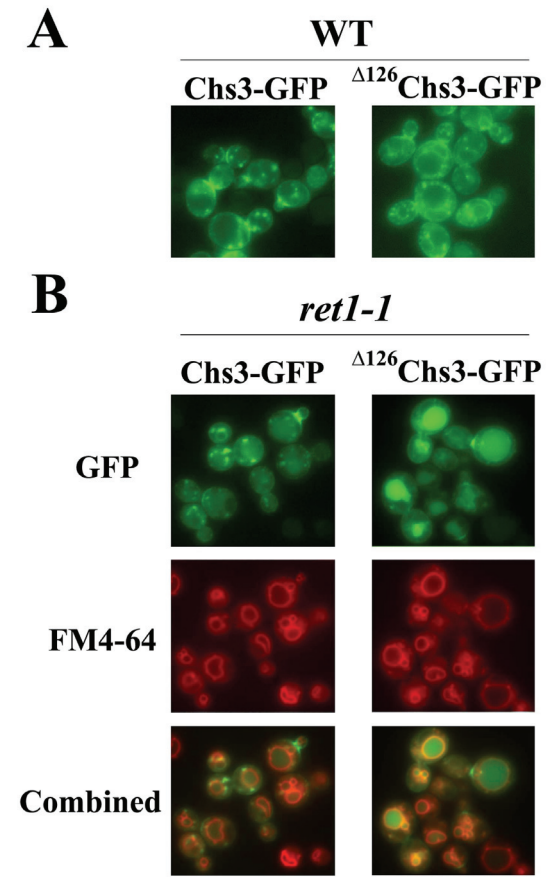
**Figure S1.** Analysis of the role of N-glycosylation on Chs3 function. (A) Molecular sizes of the mutated Chs3-3xHA proteins as indicated. Wild type Chs3 is used as control. Note the higher mobility of the truncated proteins that increased in the triple Chs3<sup>QOQ</sup> mutant. Right panel: Molecular size of the indicated Chs proteins after Endoglycosidase H treatment. Note the similar mobility of the Chs<sup>QOQ</sup> protein before and after EndoH treatment. (B) Calcofluor resistance of multiple non-glycosylated mutants of Chs3. The *chs3Δ* mutant was transformed with the different mutated forms of Chs3 and calcofluor resistance was assayed by serial dilution. (C) Calcofluor staining of the indicated strains. Note the accumulation of staining at the neck similar to that observed in the wt, but very different from the much lower and uniform fluorescence of the original *chs3Δ* mutant. (D) Localization of the Chs3<sup>QOQ</sup>-GFP. Note its accumulation at the neck and at intracellular structures similar to observed for the wt.



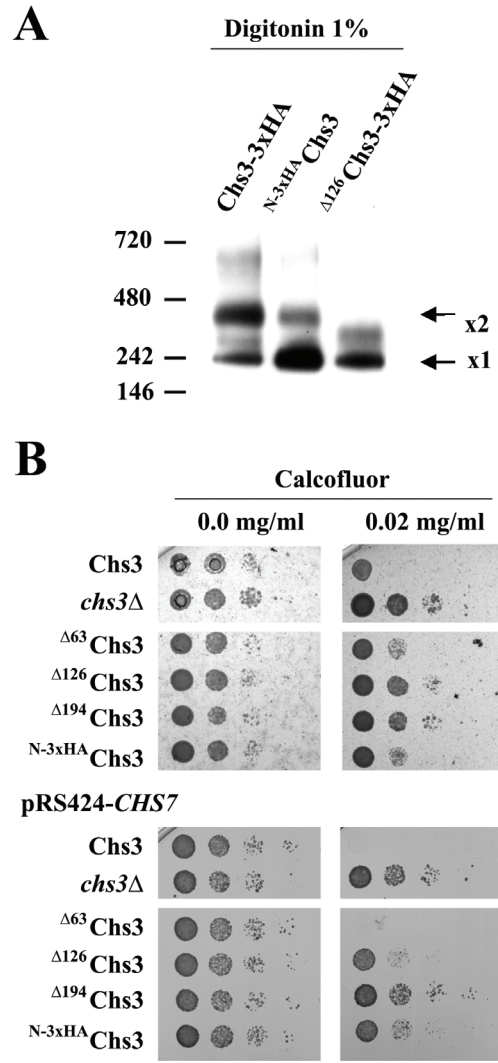
**Figure S2.** A close-up look at the Chs3 N- and C-terminal domains. (A) Sequence of the first 250 amino acids of Chs3 showing the most relevant features. The phosphorylated amino acids are underlined and the lysines replaced are in bold and boxed in grey. These are the only lysines in this region that are putative sites of ubiquitination based on bioinformatics analysis (<http://www.ubpred.org/>). The positions of the N-terminal truncations are marked by arrowheads. Shaded boxes indicate the putative TM domains. (B) Amino acid sequence of the truncated proteins showing the putative TM domains. (C) Sequence of the last 85 amino acids of Chs3 and the resulting C-terminal truncations.



**Figure S3.** Quantitative analysis of Chs3 intracellular transport. (A) Intracellular localization of the different Chs3 proteins tagged with the GFP in wild type and *CHS7*-overexpressing strains. The W303 *chs3Δ* yeast strain contains the indicated versions of Chs3 in pRS315 and pRS423::*CHS7* where indicated. The data are from experiments shown in Figures 1D and 3D. In all cases, at least 100 cells showing GFP signal were scored. See also text for a numerical analysis. (B) Quantitative analysis of the retrograde transport of Chs3. Accumulation of Chs3 and  $\Delta^{126}$ Chs3 in the vacuole (right) or ER (left) in the indicated mutants. Ordinate values are the averages of three independent experiments and the graphs also show the SD values. Pairs exhibiting statistically significant different results are indicated with asterisks. Note the significant accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 in the vacuole of all mutants as compared to the wt, linked to its lower retention at the ER. The localization of wt Chs3 is not significantly affected by the mutations analyzed, except in *rer1Δ*, which promotes its accumulation at the ER, probably because of the higher levels of the protein. The data are from experiments shown in Figure 3. In all cases, at least 180 cells showing GFP signal were scored. (C) Protein levels of the Chs3 and  $\Delta^{126}$ Chs3 in the different mutants as assessed by western blot analysis using anti-GFP and anti-Tubulin antibodies. Note the higher levels of both proteins in the *rer1Δ* mutant. (D) Co-IP of Rer1-GFP and Chs3-3xHA. Rer1 was IP with anti-GFP antibodies and the resulting immunoprecipitate was developed with anti-GFP or anti-HA antibodies. Note the higher relative amounts of  $\Delta^{126}$ Chs3 than of Chs3 after IP, indicative of a stronger interaction with Rer1.



**Figure S4.** Retrouting of Chs3 in the *ret1-1* mutant. Localization of the indicated Chs3 proteins in the wt (A) or the *ret1-1* (B) strains. Cells were grown at 28°C, a semi-permissive temperature for the *ret1-1* mutant. *ret1-1* cells were counterstained with FM4-64 as described in Materials and Methods to show vacuoles. Note the accumulation of  $\Delta^{126}$ Chs3 protein, but not of wt Chs3, in the vacuole of the *ret1-1* mutant. Note also the reduced signal for this protein in the ER of *ret1-1* mutant as compared to wt. Quantitative data of the complete experiment are shown in Figure S3.



**Figure S5.** Characterization of the N-3xHA Chs3 protein. (A) BN-PAGE gels comparing the behaviour of Chs3, N-3xHA Chs3 and  $\Delta^{126}$ Chs3 proteins. Note the stronger intensity of the lower mobility band corresponding with the dimeric form of wild type Chs3, and the much lower intensity of the higher mobility band for N-3xHA Chs3 and  $\Delta^{126}$ Chs3 proteins. Note the different mobility of the bands in these experiments compared to those shown in Figure 5. (B) Resistance to calcofluor of the strains containing the indicated versions of Chs3. Note the resistance conferred by the N-3xHA Chs3 protein, similar to that provided by  $\Delta^{126}$ Chs3.

# Material Suplementario Capítulo 3

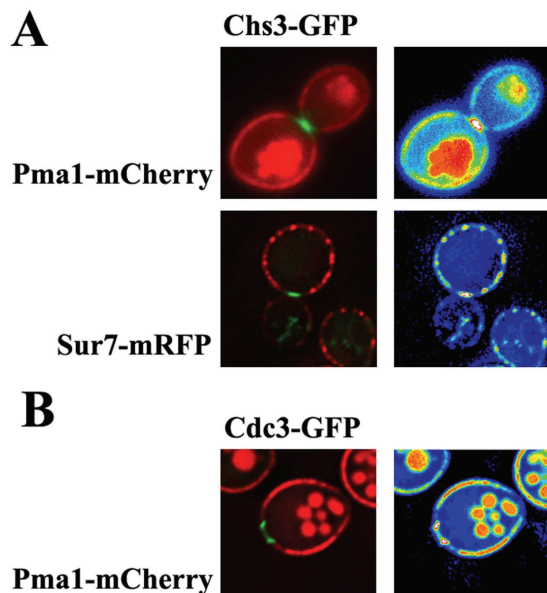
## LA COMPARTIMENTALIZACIÓN EN EL CUELLO ES LA BASE MOLECULAR DEL RECICLAJE ENDOCÍTICO DE Chs3 DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO PERO NO DURANTE EL CRECIMIENTO HIPERPOLARIZADO

TABLE S1. Yeast strains and plasmids.

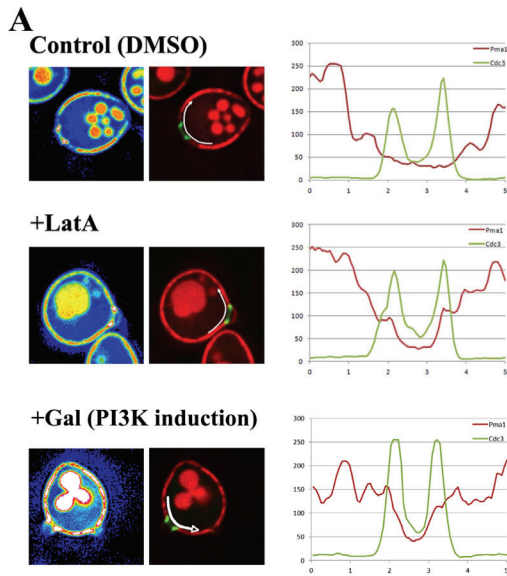
<u>Strain</u>	<u>Genotype</u>	<u>Source</u>
<i>S. cerevisiae</i>		
W303	<i>MATa</i>	<i>can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i>
CRM102	W303	<i>MATa chs3::URA3</i>
CRM872	W303	<i>MATa chs3::LEU2</i>
CRM151	W303	<i>MATa chs4::URA3</i>
CRM278	W303	<i>MATa chs4::HIS3 chs3::LEU2</i>
CRM1340	W303	<i>MATa chs3::URA3 PMA1::mCherry::NAT</i>
CRM1343	W303	<i>MATa chs3::LEU2 SUR7::mRFP::URA3</i>
CRM 926	BY4741	<i>MATa chs3::URA3 end4::KanMx4</i>
CRM 1631	BY4741	<i>MATa chs3::URA3 SYP1::mCherry::NAT</i>
CRM 1627	BY4741	<i>MATa chs3::NAT syp1::KanMx4</i>
15 DAUB	<i>MATa</i>	<i>bar1Δ URA3Ans leu2 ade1 his2 trp1</i>
CRM237	15 Daub	<i>MATa chs4::URA3</i>
CRM504	15 Daub	<i>MATa chs3::ADE1</i>
CRM1199	15 Daub	<i>MATa chs3::ADE1 chs4::URA3</i>
CRM1225	15 Daub	<i>MATa cdc28-13</i>
CRM1228	15 Daub	<i>MATa cdc28-13 chs3::URA3</i>
CRM1259	15 Daub	<i>MATa cdc28-13 chs3::URA3 chs4::NAT</i>
<i>C. albicans</i>		
CRM1572	CAI4	<i>CaCHS3/CaCHS3::GFP::URA3</i>
<b>Plasmids</b>		
pRS314- <i>CHS3</i>		Centromeric plasmid with <i>CHS3</i>
pRS314- <i>CHS3</i> -GFP		Centromeric plasmid with <i>CHS3</i> -GFP
pRS315- <i>CHS3</i>		Centromeric plasmid with <i>CHS3</i>
pRS315- <i>CHS3</i> -GFP		Centromeric plasmid with <i>CHS3</i> -GFP
pRS314- <i>CHS4</i>		Centromeric plasmid with <i>CHS4</i>
pRS315- <i>CHS4</i> -GFP		Centromeric plasmid with <i>CHS4</i> -GFP
pRS314-p <i>GAL1</i> - <i>CHS3</i> -GFP		Centromeric plasmid containing <i>CHS3</i> under the control of the <i>GAL1</i> promoter
pRS314-p <i>GAL1</i> - <i>CHS4</i> -GFP		Centromeric plasmid containing <i>CHS4</i> under the control of the <i>GAL1</i> promoter
pRS314- <i>CDC3</i> -GFP		Centromeric plasmid with <i>CDC3</i> -GFP
pRS315- <i>SNCI</i> -GFP		Centromeric plasmid with <i>SNCI</i> -GFP
pCRM964		pGEM-T containing the <i>CaCHS3</i> -GFP/ <i>URA3</i> cassette
YCpLG-PI3K		Centromeric plasmid with <i>PI3K</i> under the control of the <i>GAL1</i> promoter

**Supplementary material references.**

- Gomez, A., Perez, J., Reyes, A., Duran, A., and Roncero, C. (2009) Slt2 and Rim101 contribute independently to the correct assembly of the chitin ring at the budding yeast neck in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **8**: 1449-1559.
- Reed, S.I., and Wittenberg, C. (1990) Mitotic role for the Cdc28 protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5697-5701.
- Reyes, A., Sanz, M., Duran, A., and Roncero, C. (2007) Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J. Cell Sci.* **120**: 1998-2009.
- Robinson, M., Poon, P.P., Schindler, C., Murray, L.E., Kama, R., Gabriely, G., Singer, R.A., Spang, A., Johnston, G.C., and Gerst, J.E. (2006) The Gcs1 Arf-GAP mediates Snc1,2 v-SNARE retrieval to the Golgi in yeast. *Mol Biol Cell* **17**: 1845-1858.
- Rodríguez-Escudero, I., Roelants, F.M., Thorner, J., Nombela, C., Molina, M., and Cid, V. (2005) Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J* **390**: 613-623.
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A., and Roncero, C. (2004) *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology* **150**: 3229-3241.
- Trilla, J.A., Cos, T., Duran, A., and Roncero, C. (1997) Characterisation of *CHS4* (*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**: 795-807.



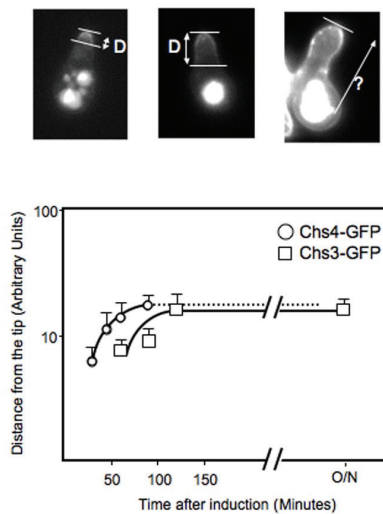
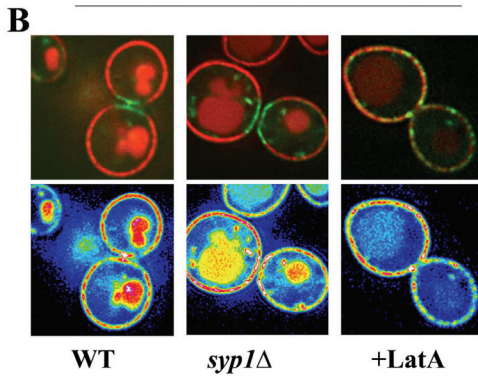
**Figure S1.** Co-localization of Chs3-GFP (A) and Cdc3-GFP (B) with the indicated PM proteins. Images were acquired as described in the text using a Delta Vision microscope. The false colour images (right) were obtained from the two-channel images by converting them to grayscale. Later, a Look-up-Table (LUT) was applied to produce false colour images representing different ranges of pixel identity. Note the empty space between the neck region containing the Chs3 or Cdc3 proteins and the rest of the membrane.



**Figure S2.** (A) Co-localization of Cdc3-GFP and Pma1-mCherry under different conditions (see materials and methods for details). The graphs represent the intensity of fluorescence in the two channels along the marked line (Fluorescence line scan). Note the almost complete disappearance of the space between the red and green signals after latA treatment or PI3K induction (Rodríguez-Escudero et al., 2005). Quantitative analysis showing the percentage of cells with optical gaps between Cdc3 and other PM proteins, before and after latA treatment. (B) Co-localization of Chs3-GFP and Pma1-mCherry in the indicated strains. Typical two-channel and false colour images are presented.

Percentage of cells showing physical gaps between the indicated proteins

	Control	+latA
Cdc3-GFP/Pma1-mCherry	54.3% (n=35)	8.9% (n=45)
Cdc3-GFP/Sur7-mRFP	47.4% (n=38)	ND



**Figure S3.** Distribution of Chs3-GFP and Chs4-GFP along the mating projection. The graph shows the distance from the tip reached by either of the proteins after the addition of galactose (see images for a scheme). The distance values are the means of measurements from at least 20 cells showing protein polarization. Cells were treated with  $\alpha$ -factor for 2 hours in raffinose medium and the expression of *CHS3* or *CHS4* was induced by the addition of galactose. The abscissas represent the minutes after galactose addition. After 120 minutes Chs4 became uniformly distributed along the cell (see Figure 4 and right-most image) and the distance from the tip cannot be determined. Chs3 covered the mating projection after 150 minutes, but its localization was not altered significantly even after O/N expression (not shown). Note the earlier visualization of Chs4 at the tip, probably because of its higher expression from the GAL1 promoter.



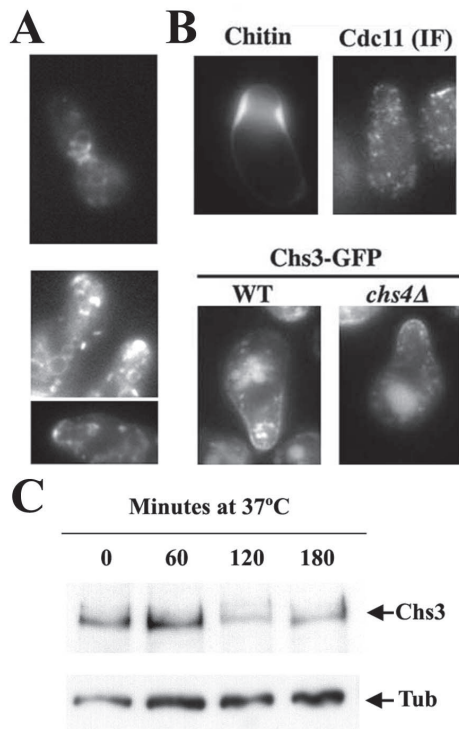


Figure S4. Hyperpolarization after Cdc28 depletion. (A) Fluorescence after staining with FM4-64. Cells were grown at 25°C (upper) or for 3 hours at the restrictive temperature (32°C) (lower) and were stained with 10 μM FM4-64 at 4°C. Note the staining at the neck and the tip of the mating projections, presumably sites of endocytosis. (B) Localization of chitin, Cdc11, and Chs3-GFP after growth at the restrictive temperature. Note the polarized distribution of Chs3-GFP in the wt but also in the *chs4Δ* mutant. (C) Chs3 levels during hyperpolarized growth. Western blots were developed with the anti-GFP or anti-tubulin antibodies as described (Gomez et al., 2009). All images show cells of *cdc28-13* (Reed and Wittenberg, 1990) mutants (CRM 1225, 1228, 1259) grown at the permissive (25°C) or restrictive (32°C) temperature, as described. Typically, cells were incubated at the restrictive temperature for 3 hours before analysis. Note the formation of the characteristic shmoos with chitin localized at the base of the projection.

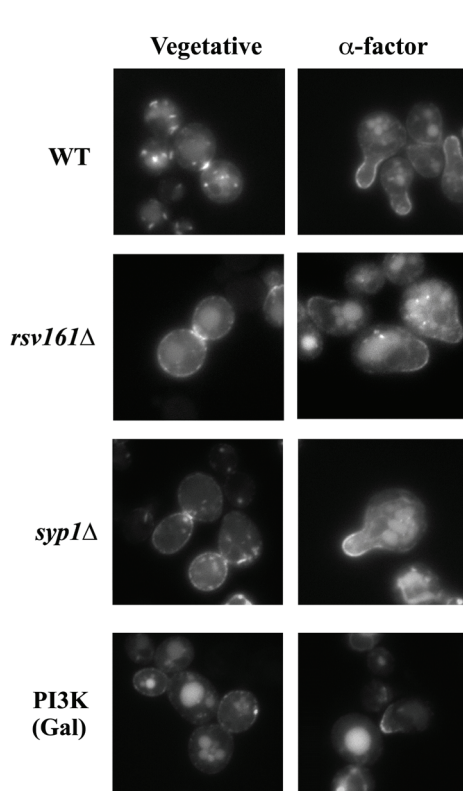
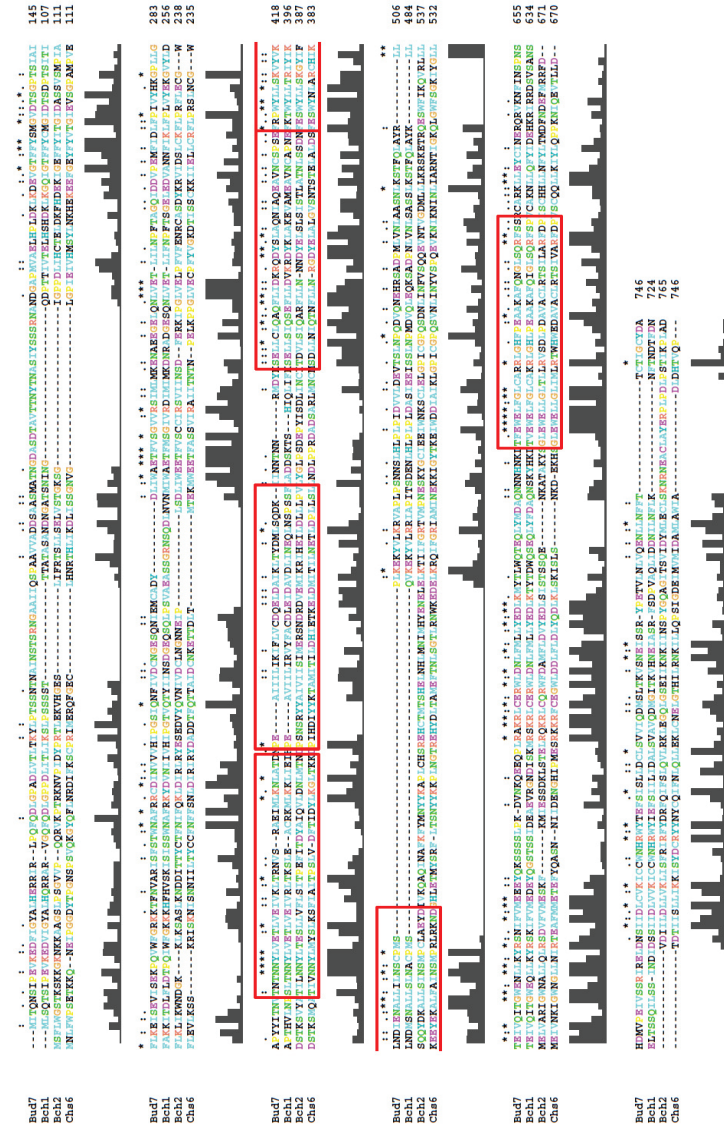


Figure S5. (A) Different effects of endocytosis mutants on Chs3 localization during budding or mating. Images were acquired in vegetatively growing cells or after 2 hours of α-factor treatment. Note the redistribution of Chs3 from the neck along the PM in the *rsv161Δ* and *syp1Δ* mutants during vegetative growth and the maintenance of Chs3 polarization during mating. (B) Effect of PI3K induction (Rodríguez-Escudero et al., 2005) during vegetative growth. Cells growing in raffinose were treated with α-factor for 2 hours and transferred to the induction medium with galactose for 30 minutes. Note the redistribution of Chs3 from the neck along the PM after PI3K induction during vegetative growth but the maintenance of Chs3 polarization during mating.

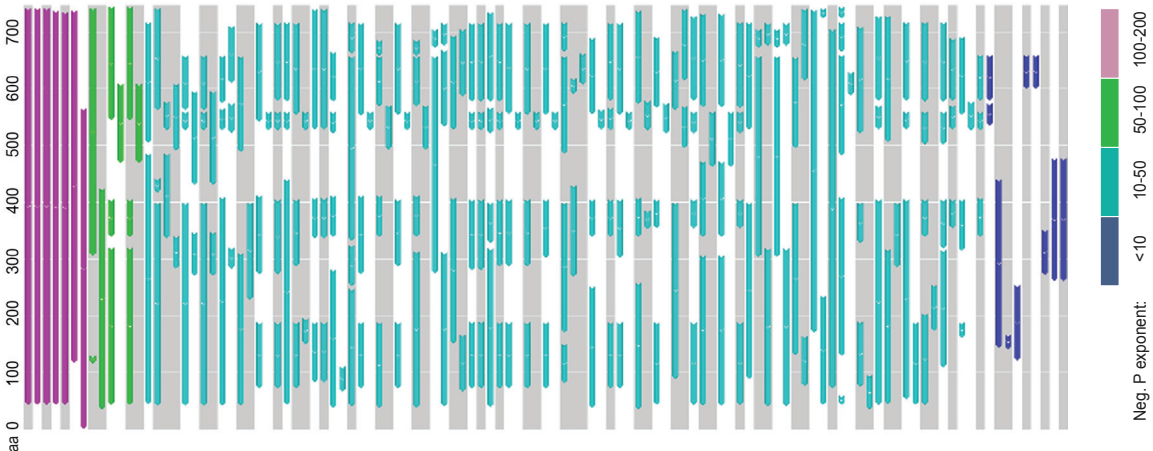


Rockenbauch et al., Figure S1

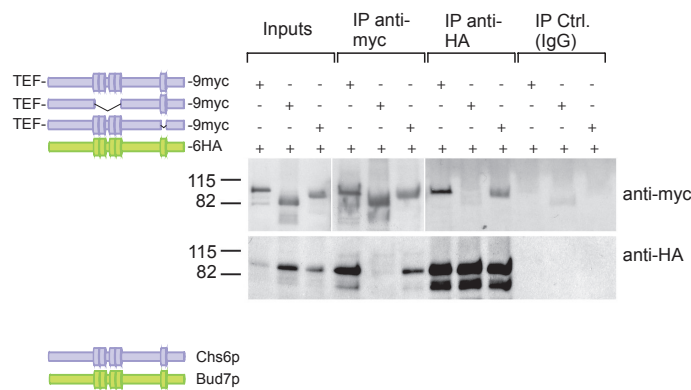
B



A

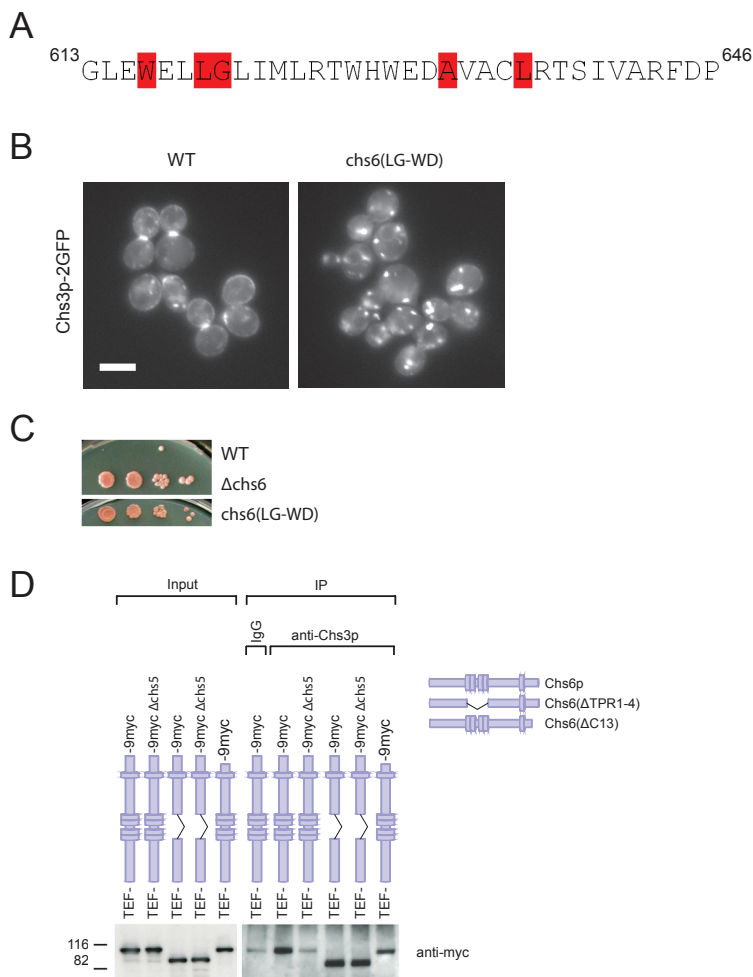


**Figure S1.** The tetrapeptide repeats of the ChAPs family are located in conserved regions (A) BLASTP alignment of *S. cerevisiae* Chs6p against ChAPs proteins in other fungi. Colours display the degree of conservation, as indicated by the scale below. Several regions appeared highly conserved, including TPR3-4 and TPR5 but also other parts such as stretch of about 114 amino acids at the N-terminus whose function is unknown. (B) Sequence alignment of the *S. cerevisiae* ChAPs. Dark grey bars indicate the degree of sequence conservation, red boxes the approximate position of the tetrapeptide repeats.



**Figure S2.** TPR1-4 is required for co-precipitation of Chs6p with Bud7p

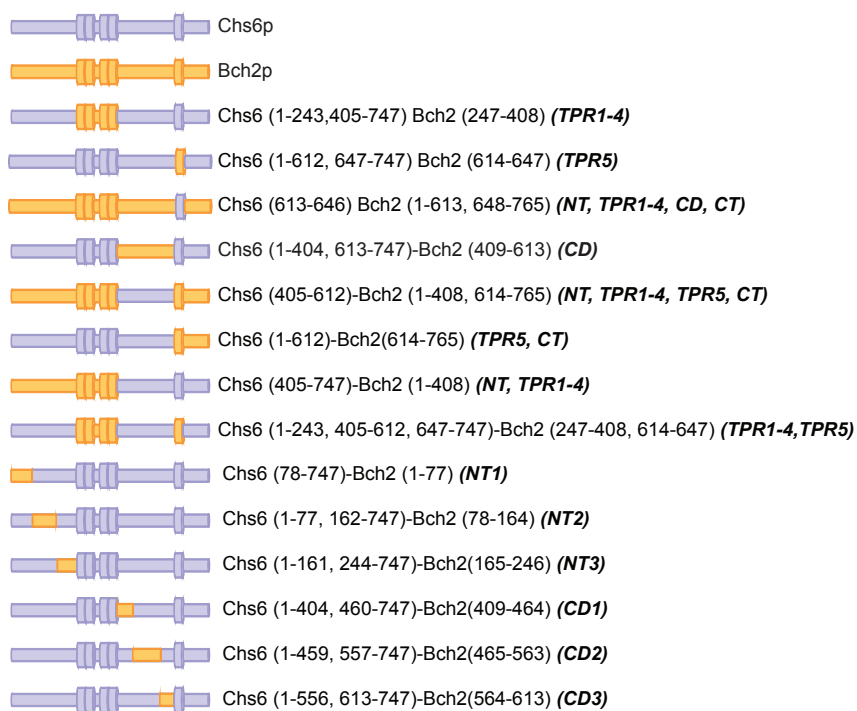
Co-immunoprecipitation was performed as in Figure 5. Interaction of Chs6( $\Delta$ TPR1-4) with Bud7p was entirely abolished, while Chs6( $\Delta$ TPR5) only showed a mild reduction in binding, suggesting that TPR1-4 is generally required for co-precipitation of the ChAPs family members. Two different exposures were cropped together because of the strong signal of the precipitated myc-tagged constructs.



**Figure S3.** Chs6p requires an intact

TPR fold for function

(A) Primary sequence of TPR5 in Chs6p. Residues, which were considered part of the conserved TPR backbone are highlighted in red. Chs6p bearing a double point mutation in two neighboring TPR backbone residues (L619G/G620W) was non-functional, as judged by mis-localization of Chs3p (B) and calcofluor resistance (C). Scale bar: 5  $\mu$ m (D) Cargo interaction and Chs5p binding by Chs6p can be decoupled. Deletion of TPR1-4 or the last 13 amino acids in Chs6p abolishes Chs5p binding but does not influence the binding of Chs6( $\Delta$ TPR1-4) and Chs6( $\Delta$ C13) to Chs3p. Cargo interaction was assessed by precipitating Chs3p from DSP-cross linked lysates with anti-Chs3p antibodies and probing precipitates for different Chs6p constructs.



**Figure S4.** Bch2p-Chs6p chromosomally generated chimera constructs used in the study. Numbers in brackets indicate amino acid sequences of Chs6p and Bch2p domains in each construct. In bold italic: Chs6p domains replaced with corresponding domains of Bch2p.