

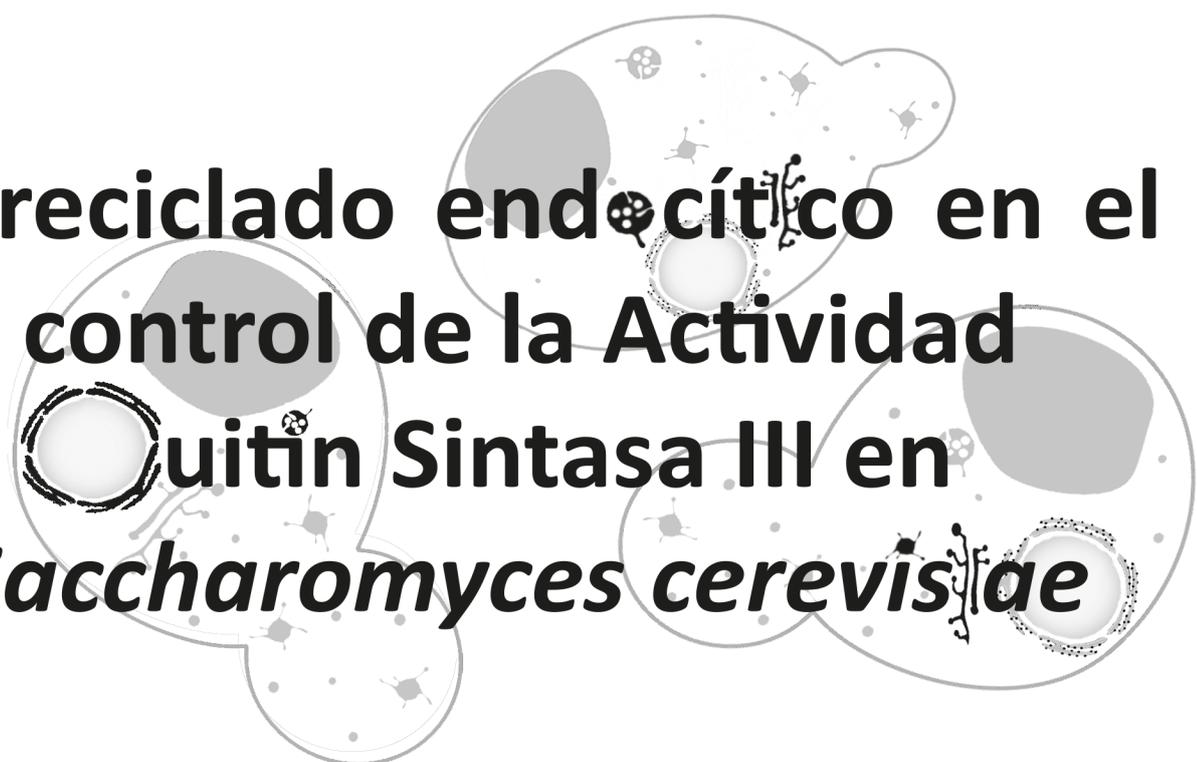


VNiVERSIDAD D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA



TESIS DOCTORAL



**El reciclado endocítico en el
control de la Actividad
Quitín Sintasa II en
*Saccharomyces cerevisiae***

IRENE ARCONES RÍOS
SALAMANCA, 2016



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética

INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA



El reciclado endocítico en el control de la Actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*

Tesis Doctoral

Irene Arcones Ríos

2016

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “El reciclado endocítico en el control de la Actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*”, presentada por la licenciada Irene Arcones Ríos para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. César Roncero, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a __ de _____ de 2016.

Fdo. Francisco del Rey Iglesias

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “El reciclado endocítico en el control de la Actividad Quitín Sintasa III en *Saccharomyces cerevisiae*”, presentada por la licenciada Irene Arcones Ríos para optar al grado de Doctor en Farmacia por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 2016.

Fdo. César Roncero Maíllo

Tomo prestada una frase de Fernando Pessoa para resumir la etapa que ahora culmina. “El valor de las cosas no está en el tiempo que duran, sino en la intensidad con que suceden. Por eso existen momentos inolvidables, cosas inexplicables y personas incomparables”.

Con estas líneas quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han participado de una u otra manera en el proceso de esta tesis doctoral.

A las que me han guiado, enseñado y ayudado a lo largo de este recorrido, y sin las cuales este trabajo no hubiera sido posible. Con una mención especial a César, por su excelente dirección y por formarme como científico en todos sus sentidos. A Charo, por ser el eje del laboratorio, por su buen hacer, su disposición y porque trabajar a su lado es un placer. Y a la Dra. A. Spang y su equipo, tanto por la generosidad con la que me acogieron en su grupo, como por su desinteresada implicación en este trabajo.

A las que me han animado y apoyado, y han hecho de ésta una etapa también muy divertida. Especialmente a los chich@s del “Café de Pared”, por tantos momentos compartidos más allá del café.

Y a las que siempre permanecen a mi lado, sea cual sea la circunstancia.

Gracias por los momentos inolvidables, las cosas inexplicables (aunque nos dediquemos a la ciencia) y por la intensidad de estos años.

Sois incomparables y ya formáis parte de esta tesis.

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido dexosirribonucleico
ALP	Fosfatasa Alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
ART	Adaptadores de tráfico relacionados con arrestinas (<i>Arrestin-related trafficking adaptors</i>)
ARF	Factor de ADP-ribosilación (<i>ADP-ribosylation factor</i>)
BAR	<i>Bin/Amphiphysin/Rvs-homology</i>
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
CCV	Vesículas cubiertas por clatrina (<i>Clathrin-Coated Vesicles</i>)
CPS	Carboxipeptidasa S
CPY	Carboxipeptidasa Y
CWI	Ruta de integridad celular (<i>Cell Wall Integrity Pathway</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSP	Ditiobis(succinimidil propionato)
DTT	Ditiotreitol
DUB	Desubiquitinasas (<i>De-ubiquitination enzymes</i>)
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
ERAD	Degradación asociada al RE (<i>Endoplasmic-reticulum-associated degradation</i>)
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
ET	Endosoma temprano
eGFP	<i>Enhanced-Green Fluorescent Protein</i>
FM4-64	[Dibromuro de N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(dietilamino) fenil) hexatrienil) piridina]
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>)
GGA	<i>Golgi-localized γ-adaptin ear homology Arf-binding proteins</i>
GPI	Glucosil fosfatidil Inositol
GTP	Guanosin tri-fosfato
HA	Epítipo inmunorreactivo procedente de la hemaglutinina del virus de la gripe
HECT	<i>Homologous to E6-AP C terminus</i>
ILV	Vesículas intralunimales (<i>Intralumenal Vesicles</i>)
Kb	Kilobase
kDa	KiloDalton

ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

LatA	Latrunculina A
LB	Medio rico para <i>E.coli</i> (<i>Luria-Bertani</i>)
MAP	Proteína activada por mitógeno (<i>Mitogen Activated Protein</i>)
MP	Membrana Plasmática
MVB	Cuerpo multivesicular (<i>Multivesicular Body</i>)
PC	Pared Celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PI	Fosfatidil Inositol
PIP/PI(4)P	Fosfatidil inositol 4-fosfato
PIP₂/PI(4,5)P₂	Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PS	Fosfatidil serina
QS	Quitín Sintasa
RE	Retículo Endoplasmático
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red Fluorescent Protein</i>)
SD	Medio sintético definido
SDS	Docecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SNARE	<i>oluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SNX	<i>Sorting Nexin</i>
SP	Septo Primario
SS	Septo Secundario
TAE	Tampón Tris-Acético EDTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red de Trans Golgi (<i>Trans-Golgi Network</i>)
UBD	Dominio de unión a ubiquitina (<i>Ubiquitin-Binding Domain</i>)
WT	Estirpe silvestre (<i>Wild type</i>)
YEPD	Medio de crecimiento rico (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR	3
2. IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR EN RESPUESTA A CAMBIOS AMBIENTALES	4
2.1. Estructura molecular de la pared celular de <i>S.cerevisiae</i>	4
2.2. Importancia biológica de la pared celular.....	5
2.3. La pared celular en la respuesta a estrés.....	6
2.4. La quitina y su implicación en la respuesta de emergencia.....	6
3. ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA III: Chs3	9
3.1. Chs3, proteína transmembrana.....	9
3.2. Tráfico intracelular de Chs3.....	9
3.2.1. Síntesis y salida del RE en vesículas COPII.....	9
3.2.2. Salida de Chs3 del TGN: el exómero.....	11
3.2.3. Chs3 en la MP y endocitosis: Chs4.....	12
3.2.4. Reciclaje de Chs3: vesículas cubiertas por clatrina.....	13
3.3. Topología de Chs3.....	15
4. REMODELAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA COMO RESPUESTA ADAPTATIVA Y CONTROL DE CALIDAD. ENDOCITOSIS	16
5. TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	17
5.1. Dinámica de la ruta endosomal.....	18
5.2. Reciclado de proteínas de membrana.....	19
5.2.1. Vesículas recubiertas por clatrina y sus adaptadores.....	21
5.2.2. Retrómero.....	24
5.3. Degradación de proteínas transmembranales: el camino hacia la vacuola.....	27
5.3.1. Ruta endocítica a la vacuola: ruta del cuerpo multivesicular.....	27
5.3.2. Otros caminos a la vacuola.....	30
6. PAPEL DE LA UBIQUITINA EN EL TRÁFICO DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA	30
6.1. Ubiquitinación de proteínas.....	31
6.2. Rsp5, la E3 ubiquitin ligasa de <i>S.cerevisiae</i>	31
6.2.1. Papel de la ubiquitinación en el tráfico de proteínas de membrana.....	31
6.2.2. Tráfico de Golgi a endosomas.....	32
6.2.3. Endocitosis mediada por ubiquitina.....	34
6.2.4. Reconocimiento por el complejo ESCRT y formación del MVB.....	34

ÍNDICE

6.4. "Arrestin-related trafficking adaptors" o ART.....	34
6.4.1. Mecanismos de regulación de las arrestinas.....	36
7. Chs3, PARADIGMA EN EL ESTUDIO DEL TRÁFICO DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA.....	37
ANTECEDENTES Y OBJETIVO.....	39
RESULTADOS.....	43
1. Chs3 VIAJA POR LA RUTA ENDOSOMAL TARDÍA O DEL MVB.....	45
1.1. Tráfico de Chs3 en mutantes del complejo ESCRT y retrómero.....	46
1.2. Niveles de Chs3 en ausencia de ESCRT y retrómero funcionales.....	48
2. Chs3 ES RECICLADO DE LOS ENDOSOMAS TARDÍOS POR EL RETRÓMERO DEPENDIENDO DE SU EXTREMO N-TERMINAL.....	49
2.1. Localización de las truncaciones N-terminal y C-terminal de Chs3 en los mutantes de ESCRT y retrómero.....	49
2.2. Determinación de la región N-terminal de Chs3 implicada en el reconocimiento por el retrómero.....	50
2.3. Chs3 interacciona físicamente con el retrómero por su extremo N-terminal.....	51
2.4. Análisis de la funcionalidad de las truncaciones N-terminales de Chs3.....	52
3. EL TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE Chs3 ESTÁ REGULADO POR UBIQUITINACIÓN.....	55
3.1. Determinación de las lisinas potencialmente ubiquitinables de Chs3 y generación de las proteínas mutante de ubiquitinación de Chs3.....	55
3.2. Caracterización de las proteínas Chs3 deficientes en ubiquitinación.....	56
3.3. La ubiquitinación N-terminal de Chs3 regula su tránsito por la ruta endosomal tardía.....	58
3.4. Chs3 interacciona con el complejo ESCRT de manera dependiente de su ubiquitinación.....	59
4. Chs3 ES UBIQUITINADA EN LA MP POR LA UBIQUITINA LIGASA Rsp5.....	61
4.1. Análisis de los niveles de ubiquitinación de Chs3.....	61
4.2. Rsp5, la ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de Chs3.....	62
4.3. La ubiquitinación N-terminal de Chs3 tiene lugar en la MP.....	63
5. LA UBIQUITINACIÓN DE Chs3 EN LA MP DEPENDE DE LA α-ARRESTINA Rod1/Art4.....	67
5.1. Determinación de la proteína ART responsable de mediar la ubiquitinación N-terminal de Chs3.....	67
5.2. La función de Art4/Rod1 en el tráfico de Chs3 no está regulada por la fuente de carbono....	70
5.3. Niveles de ubiquitinación de Chs3 en ausencia de Art4/Rod1.....	71
6. EL RECICLADO ENDOSOMAL TARDÍO CONTRIBUYE AL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTÁSIS DE Chs3 TRAS LA RESPUESTA A ESTRÉS.....	73

7. LA UBIQUITINACIÓN DE LA LISINA DEL EXTREMO C-TERMINAL DE Chs3 REGULA SU RECICLADO A TRAVÉS DE ENDOSOMAS TEMPRANOS / TGN.....	76
7.1. Caracterización de la proteína Chs3 ^{K1157R}	76
7.2. Papel de Rcy1 en el tráfico de Chs3.....	78
7.3. Caracterización del tráfico endosomal temprano en los mutantes carentes de ubiquitinación de Chs3.....	80
8. EL BLOQUEO DE Chs3^{1K} EN ENDOSOMAS TEMPRANOS/TGN ESTÁ RELACIONADO CON EL PAPEL DEL ADAPTADOR DE CLATRINA GGA1.....	82
8.1. Colocalización de Chs3 y Chs3 ^{1K} con los adaptadores de clatrina.....	82
8.2. Análisis del fenotipo de sensibilidad o resistencia a calcoflúor de cepas mutantes de los adaptadores de clatrina.....	84
8.3. Análisis de la función de los adaptadores GGAs en el tráfico de Chs3.....	85
8.4. Relación entre los complejos adaptadores AP-1, Gga1 y la ubiquitinación C-terminal de Chs3.....	88
8.5. Los adaptadores de clatrina Gga1 y Gga2 no son redundantes.....	89
DISCUSIÓN GENERAL.....	93
1. EL RECICLADO DE Chs3 ESTÁ MEDIADO POR DOS MECANISMOS INDEPENDIENTES: AP-1 Y RETRÓ-MERO.....	95
1.1. Reconocimiento de Chs3 por el retrómero.....	96
2. PAPEL BIOLÓGICO DEL TRÁFICO DE Chs3 POR LA RUTA ENDOSOMAL TARDÍA.....	97
3. DOS SEÑALES DE UBIQUITINACIÓN PARA REGULAR EL TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE LA PROTEÍ-NA Chs3.....	99
4. ¿POR QUÉ UN TRÁFICO TAN COMPLEJO PARA UNA PROTEÍNA NO ESENCIAL?.....	101
CONCLUSIONES.....	103
MATERIALES Y MÉTODOS.....	107
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	109
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.....	109
2.1. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	109
2.2. Medios de cultivo para <i>S.cerevisiae</i>	109
2.3. Medios suplementados con drogas.....	110
3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	110
3.1. Obtención de ADN.....	110
3.2. Tratamientos enzimáticos del ADN.....	111

ÍNDICE

3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	111
3.4. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	111
3.5. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	112
3.6. Vectores de <i>S.cerevisiae</i> empleados.....	112
3.7. Construcción de plásmidos.....	112
4. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIONES.....	113
4.1. Microscopía de fluorescencia.....	113
4.1.1. Tinción con calcoflúor.....	114
4.1.2. Fluorescencia directa con proteínas de fusión.....	114
4.1.3. Tinción con FM4-64.....	114
4.2. Microscopía confocal: experimento de colocalización.....	115
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	115
6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	115
6.1. Obtención de extractos de proteínas.....	115
6.2. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección.....	116
6.3. Purificación en tándem de proteínas con marcaje HBH.....	117
6.4. Purificación de proteínas con marcaje –His.....	118
6.5. Co-inmunoprecipitación.....	119
6.6. Co-inmunoprecipitación entre moléculas de Chs3.....	120
APÉNDICE.....	121
1. Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.....	123
2. Cepas de <i>E.coli</i> empleadas en este trabajo.....	125
3. Oligonucleótidos más relevantes empleados en este trabajo.....	125
4. Plásmidos empleados en este trabajo.....	128
BIBLIOGRAFÍA.....	131

INTRODUCCIÓN

1. *S.cerevisiae* COMO MODELO DE ESTUDIO DEL TRÁFICO INTRACELULAR

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, comúnmente conocida como la levadura del pan, debido a su uso en la producción de este alimento, o como la levadura de gemación, por la forma en que se reproduce, debe su nombre científico a la gran afinidad por el azúcar (*Saccharo-*) de este hongo (*-myces*) y a su empleo en la fermentación de la cerveza (*cerevisiae*). La existencia de técnicas experimentales para el aislamiento, mantenimiento y cultivo puro de cepas explican tanto el amplio desarrollo de aplicaciones industriales, como su papel fundamental en investigación, al erigirse desde hace décadas como organismo eucariótico modelo (Feyder et al., 2015) . Su empleo tan extendido en investigación se debe a una serie de ventajas, tales como:

- Fisiología celular muy conservada en eucariotas superiores.
- Rápido crecimiento en medios de cultivos simples (su tiempo de generación es aproximadamente de 1.5 horas en medio rico). Además, se puede conservar fácilmente tanto a corto como a largo plazo, en placas a 4°C o en glicerol a -80°C respectivamente.
- 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 ADN y manipulación genética.

El empleo de *S.cerevisiae* en investigación también se ha beneficiado del conocimiento desde hace más de 20 años de la secuencia completa de su genoma, lo que además de facilitar la generación de mutantes, ha dado lugar a estudios a gran escala de genómica, proteómica, etc.

Los estudios realizados en *S.cerevisiae* han permitido la identificación de la mayor parte de efectores, complejos proteicos y rutas de tráfico en células eucariotas, la mayor parte de los cuales se encuentran conservados. La ruta secretora fue la primera elucidada gracias, principalmente, al trabajo desarrollado en el laboratorio del Dr. Randy Schekman en la década de 1980. Así, se aislaron los mutantes *sec*, incapaces de secretar enzimas extracelulares, y esos genes *SEC* fueron identificados como codificadores de efectores claves de la maquinaria secretora. Posteriormente se elucidaron los genes que participan en las rutas que dirigen las proteínas desde el aparato de Golgi a la vacuola, bien a través de endosomas (vacuolar protein sorting o ruta VPS), o bien directamente (fosfatasa alcalina o ruta ALP). Así mismo, se demostró que las proteínas de membrana pueden ser internalizadas por endocitosis (END) y transportadas a los endosomas, donde unas serán señalizadas para ser degradadas en la vacuola y otras redirigidas hacia el aparato de Golgi para ser recicladas (ruta RCY)(Feyder et al., 2015) .

La alteración del tráfico de proteínas no sólo es importante en la fisiología de las levaduras, sino que está detrás de gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo desórdenes neurodegenerativos o cáncer [revisado en (Howell et al., 2006)]. Así mismo, muchas de estas rutas de tráfico son empleadas por virus y toxinas. Por lo tanto, el desarrollo de modelos adicionales de regulación del tráfico intracelular en *S.cerevisiae* es fundamental para seguir aportando luz al complejo tráfico intracelular de proteínas.

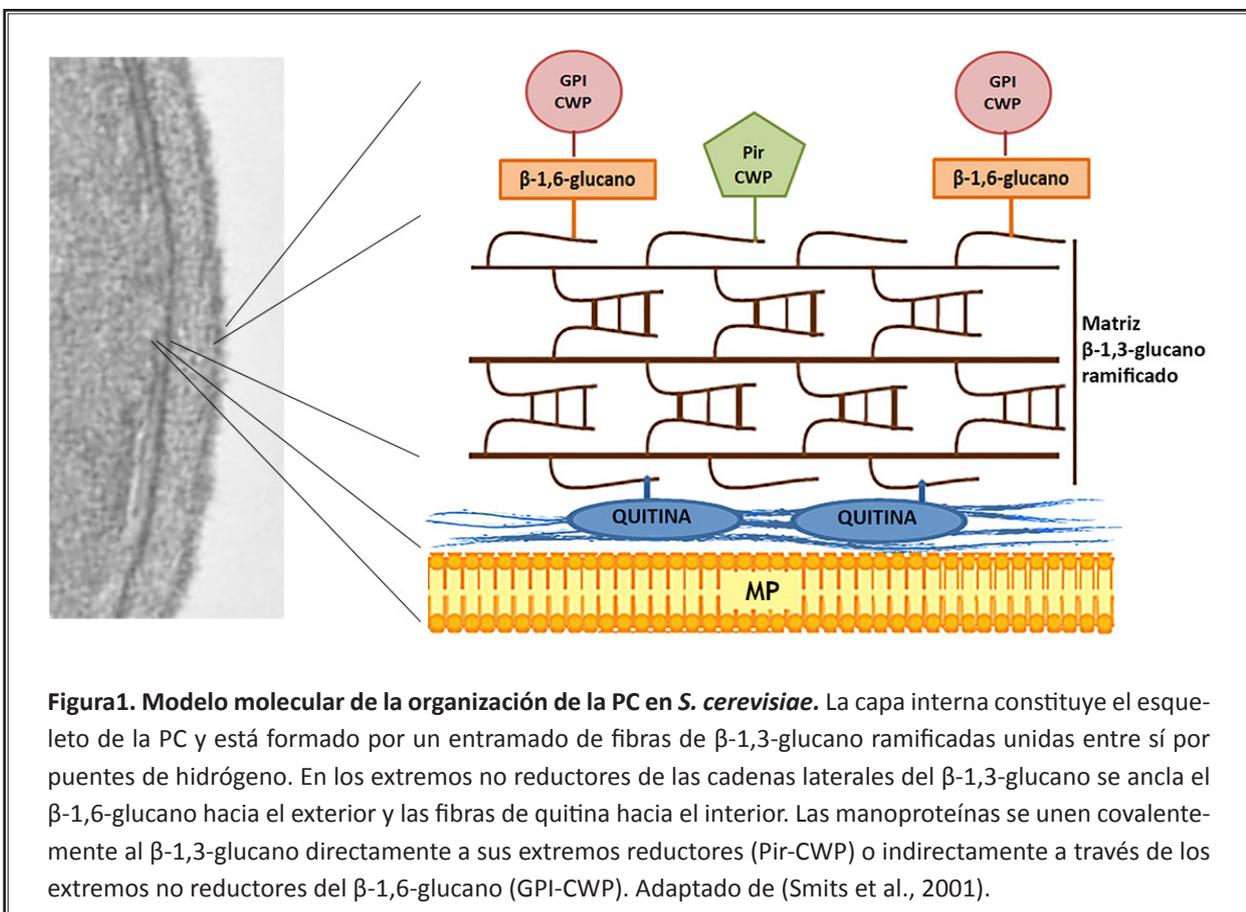
2. IMPORTANCIA DE LA PARED CELULAR EN RESPUESTA A CAMBIOS AMBIENTALES.

La pared celular (PC) es una estructura que recubre la membrana plasmática (MP) y está en contacto directo con el medio externo. Está presente en una gran diversidad de grupos taxonómicos como hongos, plantas, algas, bacterias y arqueas, pero ausente en células animales.

La PC de las levaduras es una estructura a la vez, fuerte y elástica, esencial no solo para el mantenimiento de la forma e integridad celular, sino también para la progresión a lo largo del ciclo. Durante el crecimiento y en respuesta a cambios ambientales, la pared celular es remodelada de manera polarizada y altamente regulada en un proceso que está principalmente bajo el control de la cascada de integridad celular (CWI de sus siglas en inglés).

2.1. Estructura molecular de la pared celular de *S.cerevisiae*.

Las levaduras invierten un considerable gasto energético en la construcción de la PC, que supone entre un 10 y un 25% del peso seco de la célula dependiendo de las condiciones de crecimiento. Al microscopio electrónico la PC muestra dos capas concéntricas. La capa interna, menos densa a los electrones, tiene un aspecto fibrilar y está compuesta por los polisacáridos β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y quitina. Esta capa sirve de anclaje a la capa externa, más densa a los electrones y constituida por manoproteínas. Todos estos componentes están conectados entre sí formando una robusta red que protege la célula y evita el escape de las manoproteínas al medio extracelular (Cabib and Arroyo, 2013) (**Figura 1**).



El grueso de la pared celular lo constituye el β -1,3-glucano, que es sintetizado por la β -glucán sintasa Fks1. Este compuesto está moderadamente ramificado y forma una red tridimensional elástica que se mantiene unida entre sí por puentes de hidrógeno con las cadenas laterales. Esta red es la responsable, a la vez, de la fuerza mecánica y la elasticidad de la PC. A este entramado se van a unir covalentemente la quitina hacia el interior y el β -1,6-glucano hacia el exterior. La quitina al unirse al β -1,3-glucano, modifica las propiedades de este impidiendo su remodelado y actuando como andamiaje para reforzar la PC (Cabib et al., 2012). El β -1,6-glucano, aunque relativamente minoritario, es un componente fundamental, pues a través de sus extremos no reductores se unen las manoproteínas ancladas a glucosil-fosfatidil-inositol (GPI-CWP). Además, existe un segundo grupo de manoproteínas, las Pir (**P**roteínas con **r**epeticiones **i**nter**n**as) que parecen tener un papel en la estabilidad de la PC y se unen covalentemente y de forma directa a los extremos no reductores del β -1,3-glucano (Klis et al., 2006). Las manoproteínas de la PC incluyen proteínas de adhesión celular, como aglutininas y floculinas, enzimas con actividad hidrolasa o transglicosilasa y proteínas estructurales (Cabib and Arroyo, 2013).

2.2. Importancia biológica de la Pared Celular.

A pesar de su aparente rigidez, la pared celular es una estructura plástica y dinámica que debe adaptarse a los continuos cambios morfológicos de la célula que tienen lugar durante el ciclo celular. De la misma manera, debe modificar su composición y estructura en respuesta a factores externos que puedan afectar a la integridad celular. Esto se consigue mediante un continuo equilibrio entre síntesis y degradación de los polímeros que la constituyen.

La pared celular de la levadura tiene cuatro funciones principales. En primer lugar, previene la lisis osmótica. En la naturaleza, las levaduras se enfrentan a cambios rápidos y extremos en el medio ambiente, en particular cambios en el potencial osmótico. Por ejemplo, células de *S.cerevisiae* que residan en la piel de la uva, rica en azúcares, pueden quedar expuestas instantáneamente a un choque hipo-osmótico provocado por la lluvia. Para sobrevivir a esta rápida disminución de la osmolaridad extracelular, la célula debe limitar el flujo de agua hacia su interior para evitar su lisis y mantener un medio apropiado en el que tengan lugar las reacciones bioquímicas. La PC establece un balance por el cual la fuerza que conduce el agua hacia el interior celular debido al gradiente osmótico es contrarrestada por la presión de turgencia que generan la membrana plasmática y la pared celular.

En segundo lugar, la PC ofrece protección frente a daños mecánicos. La combinación de fuerza y elasticidad de su estructura proporcionan una barrera efectiva frente a las fuerzas de compresión y tensión.

También es fundamental para el establecimiento y mantenimiento de la forma celular, estrechamente ligada a la división y morfogénesis. La presión de turgencia es crítica para la expansión celular porque provee la fuerza necesaria para superar la cohesión molecular de la PC. Esta presión está homogéneamente distribuida a lo largo de la superficie celular, por lo tanto, para no generar únicamente formas esféricas durante el crecimiento, la expansión de la PC debe enfocarse en regiones particulares. Para este propósito *S.cerevisiae* emplea su citoesqueleto de actina.

INTRODUCCIÓN

Por último, la PC constituye el andamiaje necesario para el anclaje de glicoproteínas que van a participar en diversos procesos como el reconocimiento célula- célula, procesos de agregación, crecimiento invasivo, etc. Las glicoproteínas de la superficie celular también van a limitar la permeabilidad de la célula a macromoléculas, protegiendo así la capa de glucano de enzimas degradativas (Levin, 2011).

2.3. La pared celular en la respuesta a estrés.

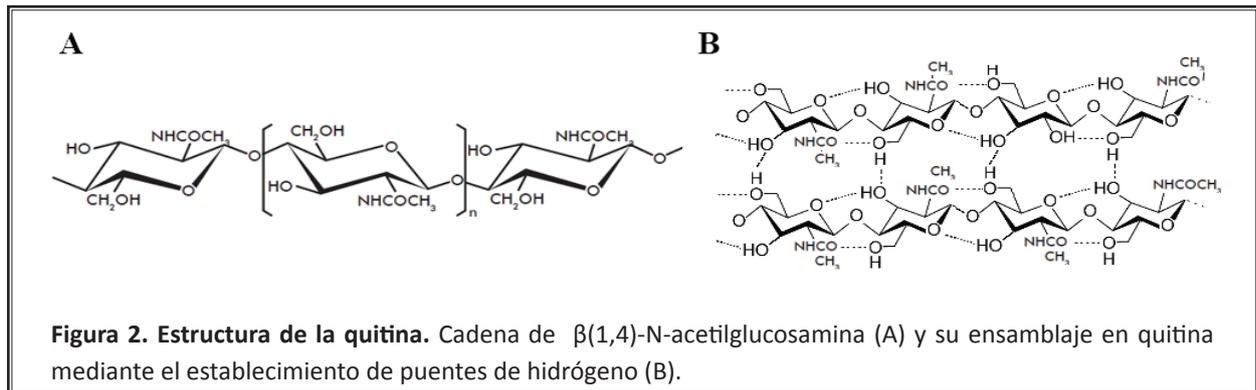
Todas las células reaccionan al estrés y cambios ambientales a través de cascadas de señalización que activan los programas de transcripción génica necesarios para hacer frente al daño celular. En la levadura *S.cerevisiae*, un amplio rango de estreses, incluidos choque térmico, choque hipo-osmótico o daño mecánico, inducen la activación de la proteína kinasa C, Pkc1, que desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. El daño en la pared es inicialmente percibido a través de las proteínas de membrana Wsc1-4 y Mid2. Wsc1 y Mid2 interactúan directamente con el factor intercambiador de nucleótidos de guanina Rom2, y facilitan el intercambio de GDP por GTP de la proteína G Rho1. Rho1-GTP es reclutado a la membrana, donde activa Pkc1 e inicia así la cascada de las MAPKinasas (mitogen-activated protein kinase) que regula una gran variedad de respuestas celulares. Esta ruta activa la kinasa Slt2, encargada de regular la actividad de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular (Levin, 2011).

Entre las respuestas que tienen lugar en la PC destaca un incremento en los niveles de β -glucanos y quitina. Este aumento en los niveles de polisacáridos es el resultado de la mayor expresión de genes dependientes de Slt2 que codifican para las β -1,3-glucan sintetasas, Fks1 y Fks2, y en menor medida para la Quitín Sintasa III (QSIII). Sin embargo, también existe un control post-transcripcional que juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular. Así, Rho1-GTP es un activador alostérico de Fks1, y la activación de Pkc1 durante el estrés de la PC provoca la despolarización de Fks1 de los sitios de crecimiento activo, que así puede participar en la reparación del daño en la pared. De manera similar, existe una regulación post-transcripcional de la QSIII (Levin, 2011; Valdivia and Schekman, 2003) que analizaremos a continuación.

2.4. La quitina y su implicación en la respuesta de emergencia.

La quitina es un polímero lineal de residuos de N-acetilglucosamina unidos mediante enlaces β -1-4 (**Figura 2A**). Este polímero se secreta al espacio periplásmico donde adopta una conformación fibrilar y cristalina denominada α -quitina, en la cual las cadenas lineales de quitina se disponen en forma paralela y/o antiparalela uniéndose mediante puentes de hidrógeno (Ruiz-Herrera and Xoconostle-Cazares, 1995) (**Figura 2B**). A su vez, la quitina se une a los polímeros de β -1,3-glucano dando lugar a una conformación altamente insoluble, que hace que la quitina sea la responsable de la rigidez de la pared celular (Cabib and Arroyo, 2013). Aunque la quitina es minoritaria en la pared, es esencial para la supervivencia de la levadura.

En la síntesis de quitina participan una serie de genes denominados chs (**chitin synthesis**) que están relacionados con tres actividades Quitín Sintasa distintas. Cada una de ellas actúa en un momento y lugar concreto durante el ciclo celular haciendo que la disposición de la quitina no sea homogénea, sino



restringida a determinadas regiones celulares [revisado en (Roncero, 2002)]. En condiciones normales de crecimiento, la quitina se encuentra altamente concentrada en el cuello formando el septo durante la citoquinesis, y en pequeñas cantidades a lo largo de la pared celular. Las tres actividades Quitín Sintasa están codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS3*. *Chs3* es la responsable tanto de la síntesis de la quitina inserta en la pared lateral durante la fase G1 temprana, como del anillo de quitina que emerge en la yema en G1 tardía, y que supone el 90% de la quitina total de la célula. *Chs2*, que se expresa específicamente durante mitosis, produce la quitina del septo primario, que separa la célula madre de la hija cerrando el anillo de quitina. *Chs1*, que se expresa en la fase G1 temprana, es la responsable de la reparación del septo durante citoquinesis (Levin, 2011; Roncero and Sanchez, 2010) (**Figura 3**).

En condiciones normales la quitina supone un 2% de la composición de la PC, pero en condiciones de daño en la PC o en mutantes defectivos en el ensamblaje de la pared, los niveles de quitina aumentan hasta suponer más del 20% de los polímeros constituyentes. Así mismo, hay un incremento en la quitina de la PC de las proyecciones conjugativas. En ambos casos, la QSIII es la responsable de este incremento en la deposición de quitina. Esta quitina se encuentra principalmente unida a las cadenas de β -1,6-glucano en la pared lateral de la levadura.

En condiciones basales, la mayor parte de *Chs3* es mantenida en un reservorio interno entre el trans-Golgi network (TGN) y los endosomas tempranos desde donde se recluta para sintetizar el anillo de quitina. Sin embargo, durante la respuesta a estrés *Chs3* es rápidamente movilizada saliendo del TGN para redistribuirse a lo largo de la MP, y poder actuar así como mecanismo de reparación. *Pkc1* participa en la movilización de *Chs3* inducida por estrés y en su fosforilación, aunque todavía se desconoce si *Chs3* es diana directa de esta kinasa (Valdivia and Schekman, 2003).

Otro de los aspectos a tener en cuenta en la respuesta de la quitina en el daño en la pared es la inducción de la expresión de *GFA1*. Este gen codifica para la glucosamina-6-fosfato sintasa, enzima limitante en la síntesis de UDP-N-acetil-glucosamina, sustrato necesario para la síntesis de quitina. En condiciones de estrés en la PC o en respuesta al tratamiento con la feromona inductora de conjugación, *GFA1* se encuentra sobre-expresado. Así mismo, la sobre-expresión ectópica de *GFA1* es suficiente para provocar un aumento en la deposición de quitina en la pared lateral, indicando que este paso biosintético es un determinante crítico en la cantidad de quitina producida por *Chs3* (Levin, 2011). La inducción de *GFA1* en respuesta al estrés de pared celular está bajo el control del factor de transcripción *Rlm1*, paso final de la ruta de integridad celular. Además, el gen *CHS3* es a su vez inducido por la vía de integridad celular bajo el

INTRODUCCIÓN

control, de nuevo, de Rlm1. Así, la ruta de integridad celular contribuye a la respuesta de emergencia de la quitina a al menos tres niveles (Levin, 2011).

Cómo acabamos de mencionar, la quitina juega un papel crucial en el mantenimiento de la integridad celular, y es Chs3 la responsable de la síntesis de la mayor parte de la quitina de la célula, no sólo durante el crecimiento vegetativo, sino también en las etapas de esporulación y conjugación. Sorprendentemente, la ausencia de CHS3 no es letal, aunque da lugar a un espectro de interacciones genéticas inusualmente amplio (Lesage et al., 2005), demostrándose que la falta de Chs3 compromete la viabilidad celular en múltiples circunstancias.

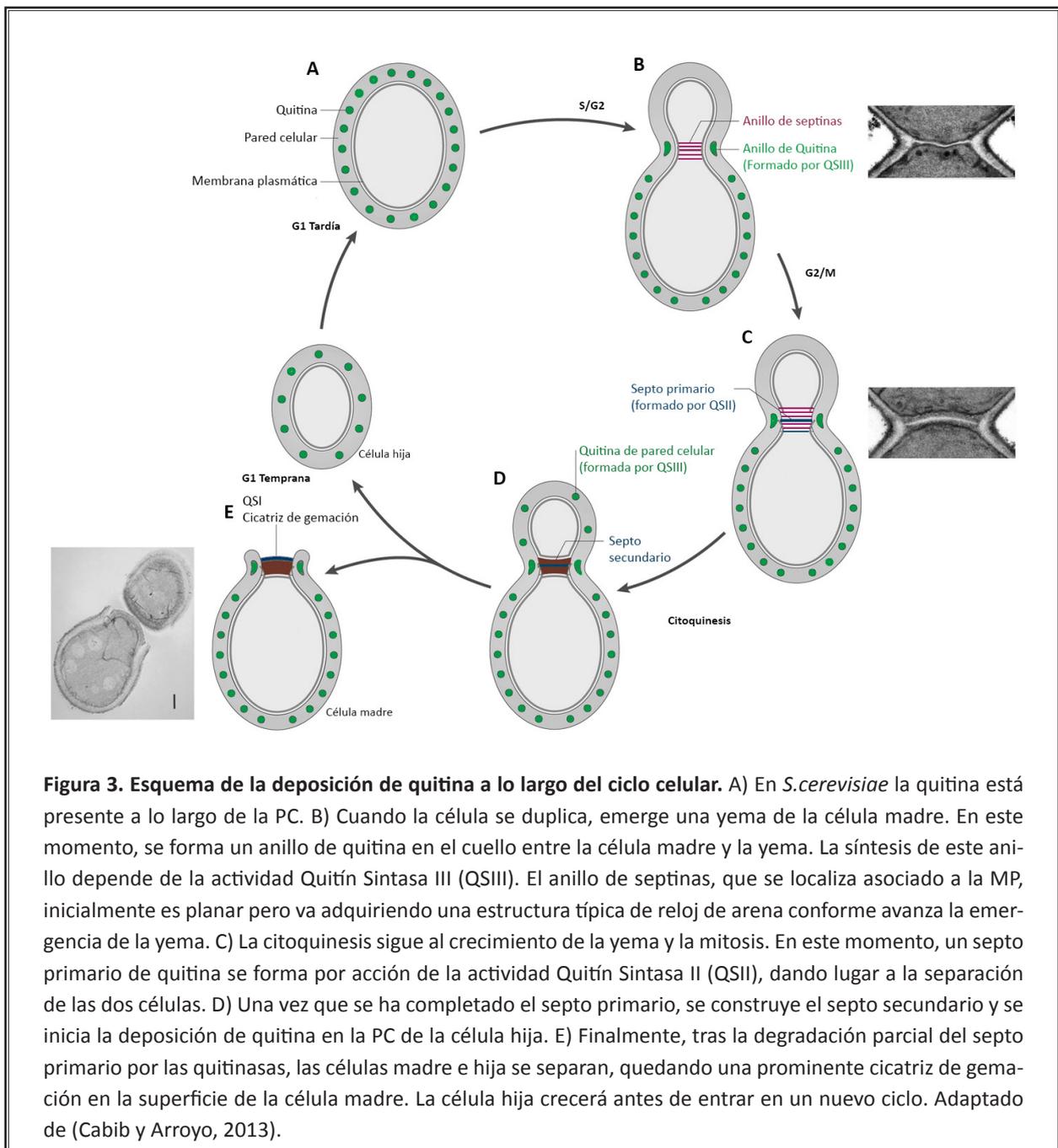


Figura 3. Esquema de la deposición de quitina a lo largo del ciclo celular. A) En *S.cerevisiae* la quitina está presente a lo largo de la PC. B) Cuando la célula se duplica, emerge una yema de la célula madre. En este momento, se forma un anillo de quitina en el cuello entre la célula madre y la yema. La síntesis de este anillo depende de la actividad Quitín Sintasa III (QSIII). El anillo de septinas, que se localiza asociado a la MP, inicialmente es planar pero va adquiriendo una estructura típica de reloj de arena conforme avanza la emergencia de la yema. C) La citoquinesis sigue al crecimiento de la yema y la mitosis. En este momento, un septo primario de quitina se forma por acción de la actividad Quitín Sintasa II (QSII), dando lugar a la separación de las dos células. D) Una vez que se ha completado el septo primario, se construye el septo secundario y se inicia la deposición de quitina en la PC de la célula hija. E) Finalmente, tras la degradación parcial del septo primario por las quitinasas, las células madre e hija se separan, quedando una prominente cicatriz de gemación en la superficie de la célula madre. La célula hija crecerá antes de entrar en un nuevo ciclo. Adaptado de (Cabib y Arroyo, 2013).

3. ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA III: Chs3.

La actividad QSIII es totalmente dependiente de la correcta llegada de Chs3 a la MP, por lo que el tráfico intracelular de Chs3, coordinado e integrado dentro de la ruta de secreción general, es clave para la regulación de esta actividad. Este tráfico, además de ser muy complejo, está altamente regulado, haciendo de Chs3 un buen modelo en el estudio del tráfico intracelular de proteínas de MP.

3.1. Chs3, proteína transmembrana.

Chs3 es una proteína de 130 KDa, con varios dominios transmembrana y glicosilada (Cos et al., 1998). Es, por tanto, una proteína cuya síntesis tiene lugar en el Retículo Endoplásmico (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 y 70% de la proteína se localiza en un conjunto de vesículas internas pertenecientes al TGN y los endosomas tempranos, históricamente denominados quitosomas (Ziman et al., 1996). La localización de Chs3 en la MP está íntimamente relacionada con la progresión del ciclo celular. Resumidamente, Chs3 se encuentra en el cuello de yemas pequeñas y grandes, estando ausente del cuello de las yemas medianas, donde se encuentra mayoritariamente en TGN/endosomas tempranos. Además, como ya se ha mencionado, la respuesta a alteraciones de la PC induce una redistribución de la proteína desde los compartimentos internos hacia la MP.

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 (superior a 3 horas) (Ziman et al., 1996). Si a esto añadimos que la sobre-expresión de *CHS3* no produce incrementos significativos en la síntesis de quitina, debemos pensar que su regulación es eminentemente postraducciona. Esto está de acuerdo con las múltiples modificaciones postraduccionales descritas para Chs3 en ensayos masivos; aunque hasta la fecha se desconoce el papel de las mismas (<http://www.yeast-genome.org/locus/S000000227>).

La selección y caracterización de mutantes resistentes a calcoflúor permitió determinar que la regulación de Chs3 es dependiente de una serie de factores que van a escoltar la proteína en su tránsito desde el RE hasta la MP (Roncero, 2002). Estos factores son las proteínas Chs4, Chs5, Chs6 y Chs7, que participan en conjunto con la maquinaria general de las rutas de secreción y endocitosis necesarias para el tráfico de Chs3. Esta regulación permite una síntesis de quitina temporal y espacialmente restringida, esencial para la viabilidad de la levadura.

3.2. Tráfico intracelular de Chs3.

3.2.1. Síntesis y salida del RE en vesículas COPII.

El punto de partida de la ruta de secreción es el RE. En este orgánulo se produce, tras la síntesis, 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 transpor-

INTRODUCCIÓN

te 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 (**Figura 6**).

Tras su síntesis, plegamiento y dimerización a través del extremo N-terminal, Chs3 sale del RE gracias a una chaperona específica, Chs7. En ausencia de ésta, Chs3 queda totalmente retenida debido a la formación de grandes agregados (Kota and Ljungdahl, 2005), como resultado de los cuales Chs3 es inactiva. Estos agregados se forman a través de los dominios transmembrana de Chs3 e impiden su carga en vesículas COPII y por tanto su salida del RE. Chs7 está en la célula en cantidades limitantes, de manera que la sobreexpresión de *CHS3* se traduce en un aumento de la retención de la proteína en el RE. Así mismo, la sobreexpresión conjunta de ambas proteínas aumenta los niveles de actividad de la QSIII, lo que sugiere que el control transcripcional de *CHS7* pudiera ser un mecanismo importante en la regulación de la síntesis de quitina *in vivo* (Trilla et al., 1999). Además, Chs3 es palmitoilada por la acil-transferasa Pfa4. Esta modificación lipídica también es necesaria para evitar la agregación y retención de Chs3 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. De esta manera, Chs7 y la palmitoilación actúan de forma coordinada para garantizar la exportación de Chs3 del RE (Lam et al., 2006).

La salida de Chs3 de RE está mediada además por el receptor Erv14, con el que interacciona a través de las hélices transmembrana. Sorprendentemente, ni la dimerización de la proteína ni Chs7 son requeridos para la interacción con este receptor. Se ha propuesto que los agregados que se forman en el mutante *chs7Δ* son tan voluminosos que superan la capacidad de carga de las vesículas COPII. Así, puede que Chs7 esté implicada en impedir la formación de estos acúmulos, favoreciendo la incorporación de Chs3 en paquetes adecuados a la capacidad de la vesícula (Sacristan et al., 2013).

La dimerización de Chs3, aunque no es esencial para su salida del RE, es monitorizada en el aparato de Golgi por un sistema de control de calidad mediado por Rer1. Este sistema media el retorno de los monómeros de Chs3 al RE en vesículas COPI para promover su ensamblaje en dímeros. Resultados de nuestro laboratorio sugieren que los monómeros de Chs3 exponen al menos dos señales distintas de retorno. Por una parte, la cubierta COPI reconoce a Chs3 por un motivo canónico di-lisina situado en el extremo C-ter-

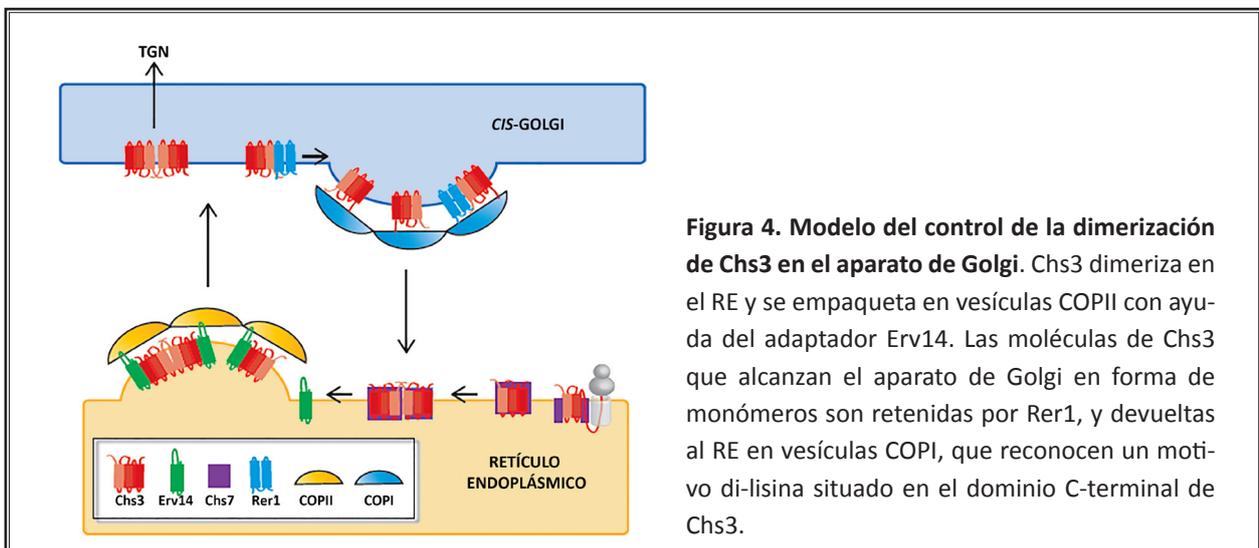


Figura 4. Modelo del control de la dimerización de Chs3 en el aparato de Golgi. Chs3 dimeriza en el RE y se empaqueta en vesículas COPII con ayuda del adaptador Erv14. Las moléculas de Chs3 que alcanzan el aparato de Golgi en forma de monómeros son retenidas por Rer1, y devueltas al RE en vesículas COPI,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

minal de la proteína, mientras que la segunda señal es dependiente del receptor Rer1, que probablemente reconozca una señal que solamente quede expuesta cuando el dímero no se ensambla correctamente (Sacristan et al., 2013) (**Figura 4**).

3.2.2. 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).

El TGN es la principal estación de salida de proteínas de la ruta de exocitosis en células eucarióticas. Aquí, los complejos adaptadores interactúan con los dominios citosólicos de los cargos por un lado, y con sus receptores por otro, para así incluir las proteínas en los transportadores apropiados que las llevarán a sus diferentes destinos. Los cargos tienen diferentes posibilidades: en dirección retrógrada, y como se mencionó anteriormente, pueden volver al RE a través de las vesículas COPI. En dirección anterógrada, pueden ir a la vacuola a través del complejo adaptador AP-3, o bien directamente a la MP en un tráfico mediado por el complejo adaptador AP-1. Además, los cargos pueden alcanzar el sistema endosomal y emplear las vías de reciclado para alcanzar la MP (Spang, 2015). Sin embargo, Chs3 emplea un mecanismo diferente. La salida de Chs3 del TGN es dependiente de dos proteínas, Chs5 y Chs6, y en ausencia de cualquiera de las dos no hay síntesis de quitina, ya que Chs3 queda retenida en el TGN (Santos et al., 1997; Ziman et al., 1998). Ambas proteínas forman parte de un complejo denominado exómero. Éste es un complejo heterotetramérico que comprende un homodímero central, constituido por la proteína Chs5, unido a un dímero de cualquiera de los miembros de la familia de proteínas denominadas ChAPs (Chs5-and-Arf1-binding proteins), Chs6, Bud7, Bch1 y Bch2, las cuales confieren la especificidad de cargo. Chs5 y las ChAPs son reclutadas desde el citosol a la membrana del TGN por la GTPasa Arf1 (Paczkowski et al., 2012; Trautwein et al., 2006).

Existe controversia a la hora de definir el exómero como una cubierta o como un complejo adaptador. A pesar de que requiere Arf1 activo para su asociación con la membrana y que interactúa directamente con el cargo (en analogía con las cubiertas COPI y COPII), no posee la habilidad intrínseca de deformar las membranas lipídicas característica de las cubiertas. Por otra parte, el exómero actúa como plataforma para reclutar cargos, comportándose como un organizador de dominios especiales en el TGN y a la vez como un complejo adaptador (Spang, 2015). Sin embargo, y contrario a los complejos adaptadores clásicos, el exómero no se encuentra preformado en el citosol, sino que se ensambla de manera gradual directamente en el TGN. Además, aunque todos los ChAPs son capaces de ensamblar exómeros funcionales, lo hacen con diferente eficacia (Huranova et al., 2016). Este ensamblaje multifactorial hace del exómero un complejo con una fina regulación, que permite a la célula una rápida respuesta para adaptarse a cambios en el medio o situaciones de estrés.

A pesar de esto, sólo se han descrito hasta el momento tres cargos del exómero: la quitín sintasa Chs3, la proteína de fusión Fus1 (Barfield et al., 2009) y la proteína priónica Pin2 (Ritz et al., 2014), todas ellas proteínas de distribución altamente polarizada. Es remarcable que tanto Chs3 como Pin2 son rápidamente endocitadas tras la exposición a estrés. Después, mientras que Chs3 es rápidamente re-exportada a la MP de manera no polarizada, para fortalecer la pared celular, Pin2 es retenida en el TGN y sólo vuelve a

ser transportada una vez que el estrés ha remitido. Esto permite postular que el transporte mediado por el exómero es particularmente importante para asegurar la correcta localización en la MP de proteínas que responden a estrés. Además, cabe destacar, que tanto Chs3 como Pin2 ciclan entre el TGN y la MP de manera dependiente de ciclo y del complejo AP-1 (Ritz et al., 2014).

A pesar de poseer un complejo específico para la salida de 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 cables de actina (Santos and Snyder, 1997). Además requiere de las tres Rab GTPasas que actúan en secreción: Ypt31/32 y Sec4. Se ha visto que la sobreexpresión de Ypt32 produce una mayor llegada de Chs3 a la MP y elude la retención típica del mutante *chs5Δ*. Además, la delección de Ypt31 e Ypt32 se traduce en una mayor acumulación de Chs3 en vesículas intracelulares (Ortiz and Novick, 2006; Zanolari et al., 2011). Esta retención es diferente dependiendo del momento del ciclo celular, de manera que *ypt31Δ* no tiene afectada la localización de Chs3 en el caso de yemas grandes, pero sí posee una considerable reducción en 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. Esto mismo indica la distribución de Chs3 en el mutante *sro7Δ*. Este efector de Sec4 se requiere en las últimas fases de la fusión con la MP reclutando a Myo2, SNAREs y al exocisto. Al contrario de lo que ocurre en el caso de *ypt31Δ*, el defecto en el tráfico de Chs3 en el mutante *sro7Δ* parece más acusado en yemas grandes que en pequeñas, sugiriendo de nuevo que la regulación en 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 RabGTPasa que dirige esta fusión, como mutantes del exocisto, tienen afectada la llegada de Chs3 al cuello (Valdivia et al., 2002; Zanolari et al., 2011).

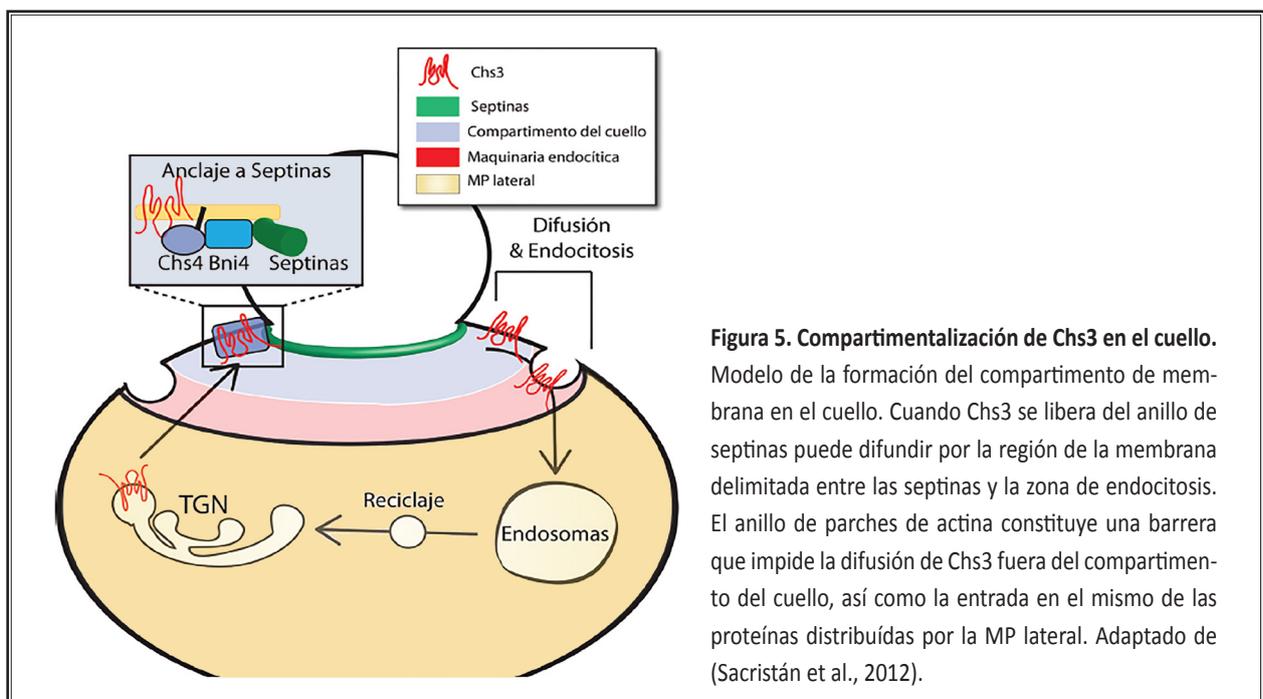
3.2.3. Chs3 en la MP y endocitosis: Chs4.

La polarización de Chs3 durante crecimiento vegetativo depende de dos fenómenos en perfecto equilibrio: un transporte específicamente dirigido a la región del cuello y una endocitosis activa que contrarresta la acumulación promovida por el mencionado transporte anterógrado (Reyes et al., 2007). Para que este equilibrio sea posible, Chs3 necesita anclarse físicamente al anillo de septinas, jugando la proteína Chs4 un papel clave en este punto (DeMarini et al., 1997), de manera que en su ausencia, Chs3 se endocita rápidamente (Reyes et al., 2007).

Chs4, hasta donde se conoce, es una proteína dedicada exclusivamente a la regulación de Chs3 mediante su estabilidad y activación. El mutante *chs4Δ*, a pesar de carecer de quitina *in vivo*, presenta actividad quitín sintasa *in vitro*, siendo esta dependiente del tratamiento de las membranas con tripsina (Choi et al., 1994). Chs3 y Chs4 interactúan físicamente y la sobreexpresión de *CHS4* aumenta considerablemente la actividad de Chs3, lo que sugiere que Chs4 es un activador de la QSIII (Ono et al., 2000), aunque se desconoce el mecanismo molecular de este proceso. Además de esta función activadora, Chs4 participa en la localización de Chs3 en el septo: Chs3 insertada en la MP interactúa con Chs4 y ésta a su vez con Bni4, una proteína con funciones más generales en el ensamblaje de la maquinaria del septo, lo que permite la unión de estas proteínas al anillo del septinas (Kozubowski et al., 2003; Sanz et al., 2004).

En ausencia de Chs4 el número de células que presentan Chs3 en el cuello es una quinta parte que en la cepa silvestre. Esto se debe a que Chs4 transloca y estabiliza Chs3 en la MP previniendo su endocitosis prematura. Dicha translocación, además, parece ir unida a una activación enzimática de la QSIII. Así, Chs4 se define como 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).

En *S.cerevisiae* las septinas y los parches de actina se ensamblan en el cuello formando dos anillos concéntricos, donde la actina ocupa la posición más externa. Este posicionamiento define un compartimento de membrana específico, en el cual va a residir Chs3. El transporte polarizado de Chs3 hacia esta región va a determinar que se pueda anclar al anillo de septinas. Ante la llegada de nuevas moléculas, la proteína se libera de su anclaje y puede difundir por la membrana hasta el anillo externo de actina donde se endocitará la proteína (Figura 5). 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 para su endocitosis (Sacristán et al., 2012).



Chs3 se inactiva funcionalmente tras la endocitosis, aunque se desconocen cuáles son las señales que dirigen este proceso. Los tres homólogos de Rab5 en *S.cerevisiae*, Ypt51, Ypt52 y Ypt53 están implicados en esta endocitosis y 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 debido a una endocitosis prematura de Chs3 (Zanolari et al., 2011).

3.2.4. Reciclaje de Chs3: vesículas cubiertas por clatrina.

Una vez endocitado, Chs3 es reciclado desde los endosomas al TGN (Figura 6). Este reciclaje depende de vesículas recubiertas por clatrina, ensambladas a su vez por distintos tipos de adaptadores: el complejo

INTRODUCCIÓN

AP-1 (Valdivia et al., 2002), las proteínas de tipo epsina Ent3/Ent5 (Copic et al., 2007) y los adaptadores GGAs (Gga1 y Gga2) (Copic et al., 2007). En ausencia de cualquiera de estos adaptadores el transporte de Chs3 diverge de la ruta normal de exocitosis, de manera que Chs3 es capaz de alcanzar la MP independientemente del exómero. Se desconoce la naturaleza de esa ruta denominada alternativa, pero se postula que parte directamente de los endosomas (Valdivia et al., 2002). Por tanto, la cubierta de clatrina retendría a Chs3 en el sistema formado por el TGN y los endosomas, previniendo su acceso a otras rutas dirigidas a la MP o la vacuola. Los datos de interacciones genéticas y físicas, y la colocalización entre los adaptadores arriba mencionados evidencia una estrecha colaboración entre ellos, haciendo difícil discernir el papel específico que desempeña cada uno en el tráfico de Chs3.

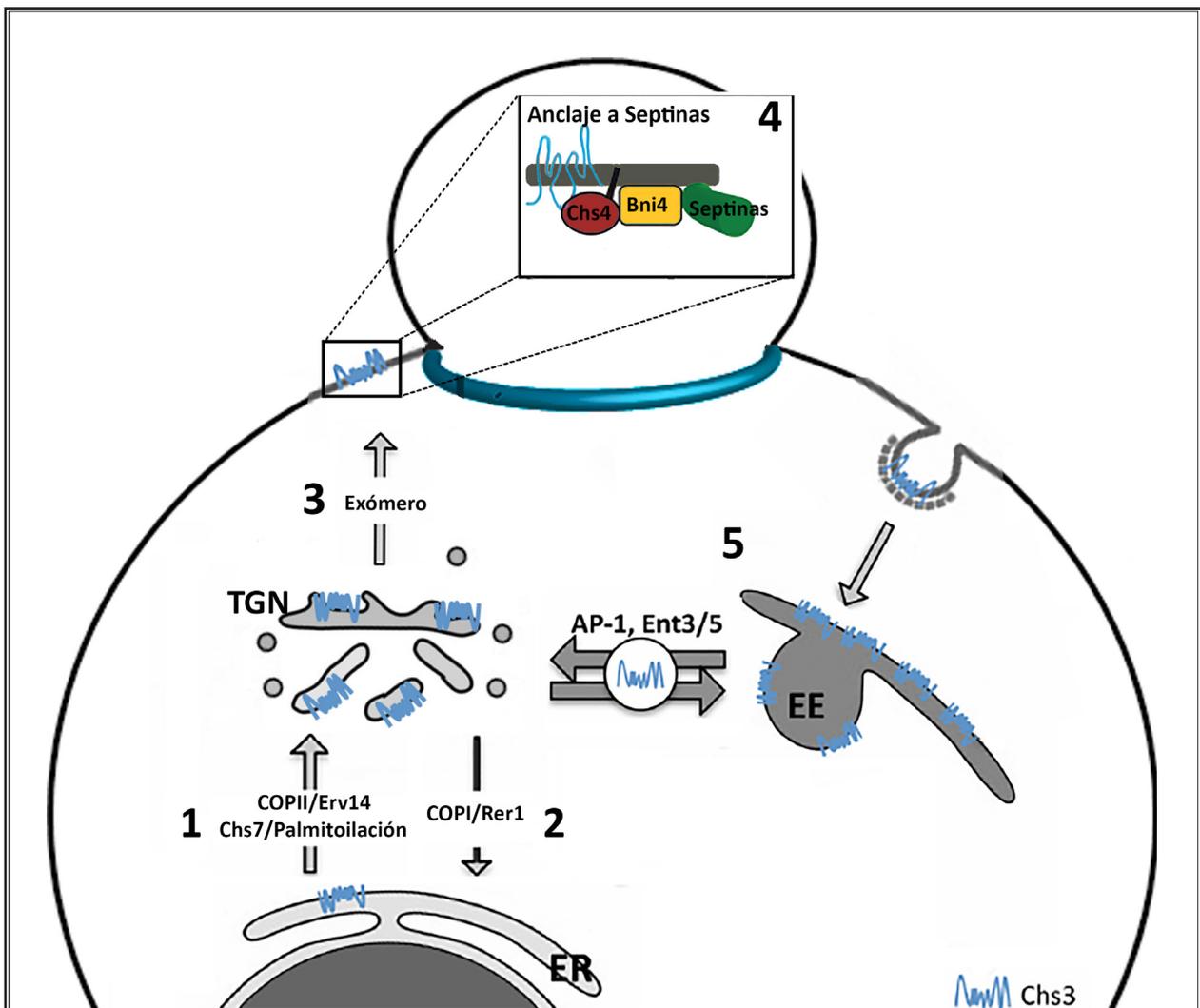


Figura 6. Esquema del tráfico intracelular de Chs3.

1. La salida de Chs3 del RE depende de su palmitoilación, de la chaperona Chs7 y del receptor Erv14.
2. Rer1 media el control de calidad en el aparato de Golgi. La proteína mal plegada y la no dimerizada vuelven al RE a través de las cubiertas COPI.
3. Chs5 y Chs6 constituyen el exómero y median la salida de Chs3 desde TGN a la MP de forma polarizada.
4. Chs4 activa a Chs3 en el cuello y media su anclaje al anillo de septinas a través de la proteína Bni4.
5. 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/Ent5.

Otro de los factores que inciden en el correcto reciclaje de Chs3 son los niveles de PI4P. Un incremento de la concentración de este fosfoinosítido, bien por la delección de la fosfatasa responsable de su eliminación, Sac1, o por la sobre-expresión de la quinasa 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).

3.3. Topología de Chs3.

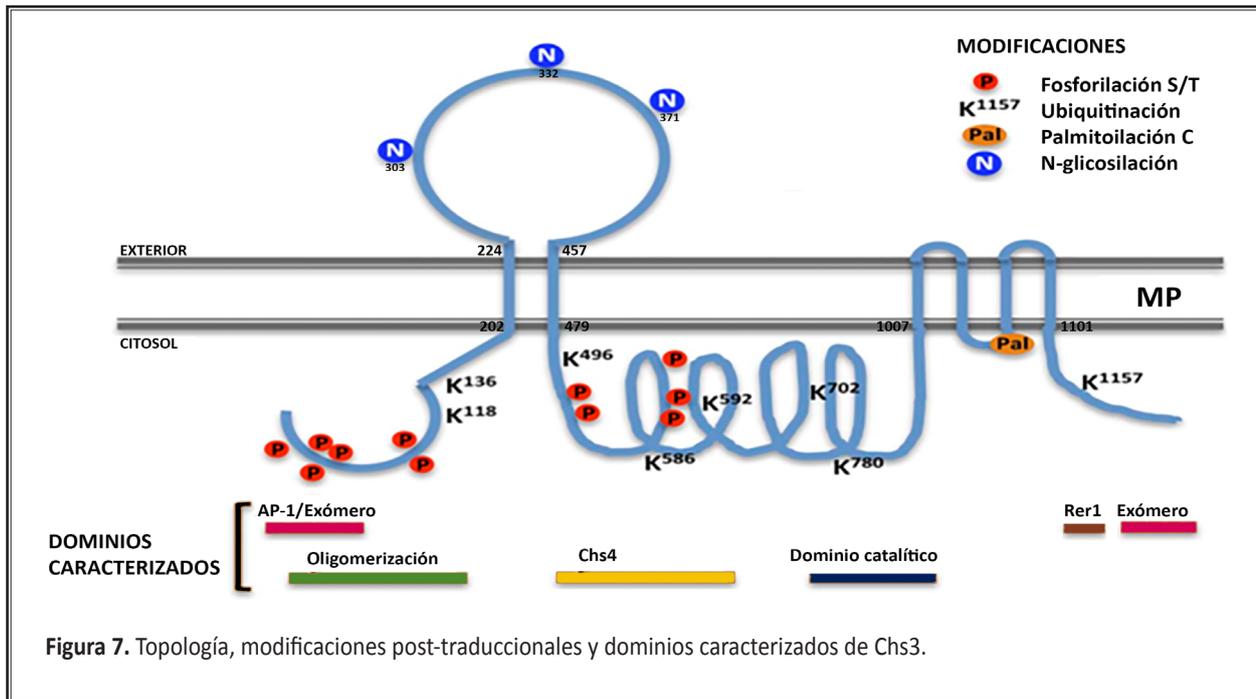
El posicionamiento de las modificaciones post-traduccionales de Chs3 sobre el esqueleto de hélices transmembrana predicho ha permitido precisar la topología de esta proteína. Así, Chs3 constaría de 6 hélices transmembrana que delimitan tres lazos extracelulares y cuatro regiones citosólicas. Los dominios citosólicos N-terminal, la extensa región globular central y el dominio C-terminal juegan un papel primordial en la regulación de Chs3 (**Figura 7**).

El dominio N-terminal es clave en la función de la proteína, pues es la región a través de la cual se produce la oligomerización de Chs3, crucial para la salida del RE y para el correcto funcionamiento de la QSIII en la MP (Sacristan et al., 2013). Además, este dominio media la interacción con dos de los complejos adaptadores que participan en el transporte de la proteína; el complejo AP-1, a través de la secuencia DEESLL situada entre los amino ácidos (aa) 17 a 25 de Chs3 (Starr et al., 2012), y el exómero, a través de los residuos D19 y E21 (Weiskoff and Fromme, 2014). El extremo N-terminal concentra gran cantidad de modificaciones post-traduccionales que incluyen diversas fosforilaciones y ubiquitinaciones, sin embargo, el papel de estas queda aún por determinar.

Chs3 está N-glicosilado en los residuos 303, 332 y 371 correspondientes al primer lazo extracelular (Sacristan et al., 2013). Aunque, de nuevo, no se ha encontrado un papel fisiológico para esta modificación.

El siguiente dominio es la región globular central. Ésta ha sido la más 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; Jimenez et al., 2010; Meissner et al., 2010; Ono et al., 2000).

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). Se ha especulado también con que este dominio contribuya a la formación 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 (Merzendorfer, 2011). Así mismo, el extremo C-terminal de Chs3 tiene un sitio de reconocimiento por el exómero, que incluiría los últimos 37 aa (Rockenbauch et al., 2012) y el motivo dilisina que media la interacción con Rer1 en la vuelta al RE (Sacristan et al., 2013).



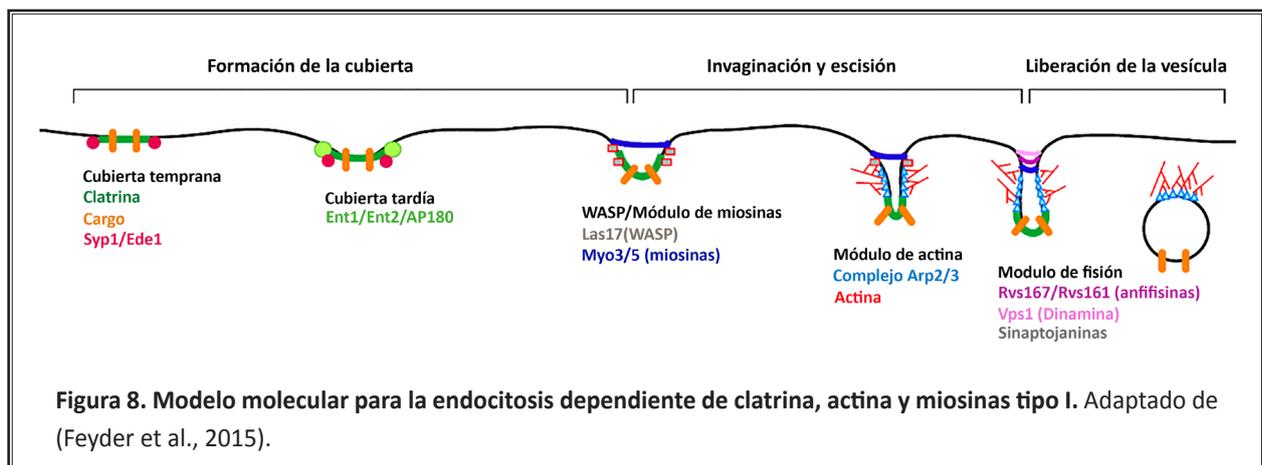
4. REMODELAMIENTO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA COMO RESPUESTA ADAPTATIVA Y CONTROL DE CALIDAD. ENDOCITOSIS.

La concentración y localización de proteínas integrales de membrana desempeña un papel crítico en el crecimiento, morfogénesis y supervivencia de las células eucarióticas. Entre las proteínas de membrana encontramos transportadores de nutrientes, canales iónicos, receptores o enzimas biosintéticas de componentes de la pared celular, como es el caso de Chs3. Así, las células remodelan la composición proteica de su MP en respuesta a señales ambientales. Este proceso de remodelado es complejo, e incluye tanto la adición de nuevas proteínas (cargos) a la MP como la eliminación de cargos de la misma por endocitosis. Este transporte de proteínas de membrana está sujeto a una regulación precisa, permitiendo así a las células una rápida adaptación a cambios en su medio ambiente. Las células van a remodelar la composición proteica de la MP para atenuar respuestas de rutas de señalización, regular la toma de nutrientes, controlar el flujo de iones a través de la MP, o como en el caso que nos atañe, sintetizar compuestos que refuercen la PC. Así, en organismos eucariotas unicelulares, como es el caso de la levadura, el remodelado de la MP juega un papel importante en la homeostasis de nutrientes, en la respuesta a estrés y en la señalización por feromonas (MacGurn et al., 2012).

Además, la célula modifica la composición de su MP como un sistema de control de calidad. A diferencia del remodelado, que es dirigido por la respuesta de la célula a las dinámicas ambientales, el control de calidad es un mecanismo de protección, que responde a factores intrínsecos de las proteínas y es esencial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este sistema limita la acumulación de proteínas que hayan excedido su vida media, o estén dañadas o mal plegadas en su sitio de acción. El control de calidad de la MP se encarga tanto del mantenimiento estructural de las proteínas de la MP, como de la eliminación de las que están alteradas. Es un sistema crítico para la supervivencia celular, porque la acumulación de este tipo de proteínas puede dar lugar a la formación de agregados proteicos tóxicos que provocan, a su vez,

la pérdida de integridad de la MP (MacGurn et al., 2012) [para una visión más detallada de este proceso ver (Babst, 2014)].

Un proceso clave en el remodelado de la membrana eucariótica es la endocitosis, proceso que permite a las células internalizar proteínas de membrana, así como medio extracelular, para posteriormente transportarlos a través de la ruta endocítica. En *S.cerevisiae* la mayoría de los 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 es dependiente de actina. Así, estructuras dinámicas de actina van a asociarse con vesículas endocíticas favoreciendo su formación, liberación de la MP y transporte hacia el citoplasma (**Figura 8**). La unión de las proteínas tempranas Syp1/Ede1 a la MP determinan el ensamblaje de la cubierta compuesta fundamentalmente por clatrina. A continuación, la polimerización de la actina ejerce la fuerza necesaria para producir la invaginación de la membrana, que posteriormente se escindirá por la acción de las anfifisina Rvs161 y Rvs167. Finalmente, la cubierta de clatrina es fosforilada, lo que marca su desensamblaje de la vesícula. La desfosforilación de los factores de la cubierta permitirá su reclutamiento para un nuevo proceso endocítico. [revisado en (Weinberg and Drubin, 2012).



La endocitosis va a permitir la internalización de las proteínas de MP y en muchos casos, también su marcaje para ser degradadas. Un regulador clave de estos dos procesos es la ubiquitinación; de hecho, para muchos de los cargos estudiados en levadura (Ste6, Ste2, Pdr5, Fur4) la ubiquitinación es necesaria y suficiente para la endocitosis (MacGurn et al., 2012), aunque también se ha descrito endocitosis independiente de ubiquitinación (Chen and Davis, 2002). Así mismo, la degradación de la mayor parte de las proteínas dañadas o mal plegadas está también señalizada con ubiquitina (Babst, 2014).

5. TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE PROTEÍNAS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA.

La endocitosis lleva las proteínas de la MP a los endosomas tempranos. Una vez en este compartimento endosomal las proteínas cargo tienen dos opciones: ser recicladas a la superficie celular, bien directamente o a través del TGN, o continuar hacia la vacuola para su degradación (**Figura 10**). Aunque el mecanismo preciso se desconoce, se postula que la competencia entre las reacciones de des-ubiquitinación y re-ubiquitinación es clave en la decisión del destino del cargo (Piper et al., 2014).

5.1. Dinámica de la ruta endosomal.

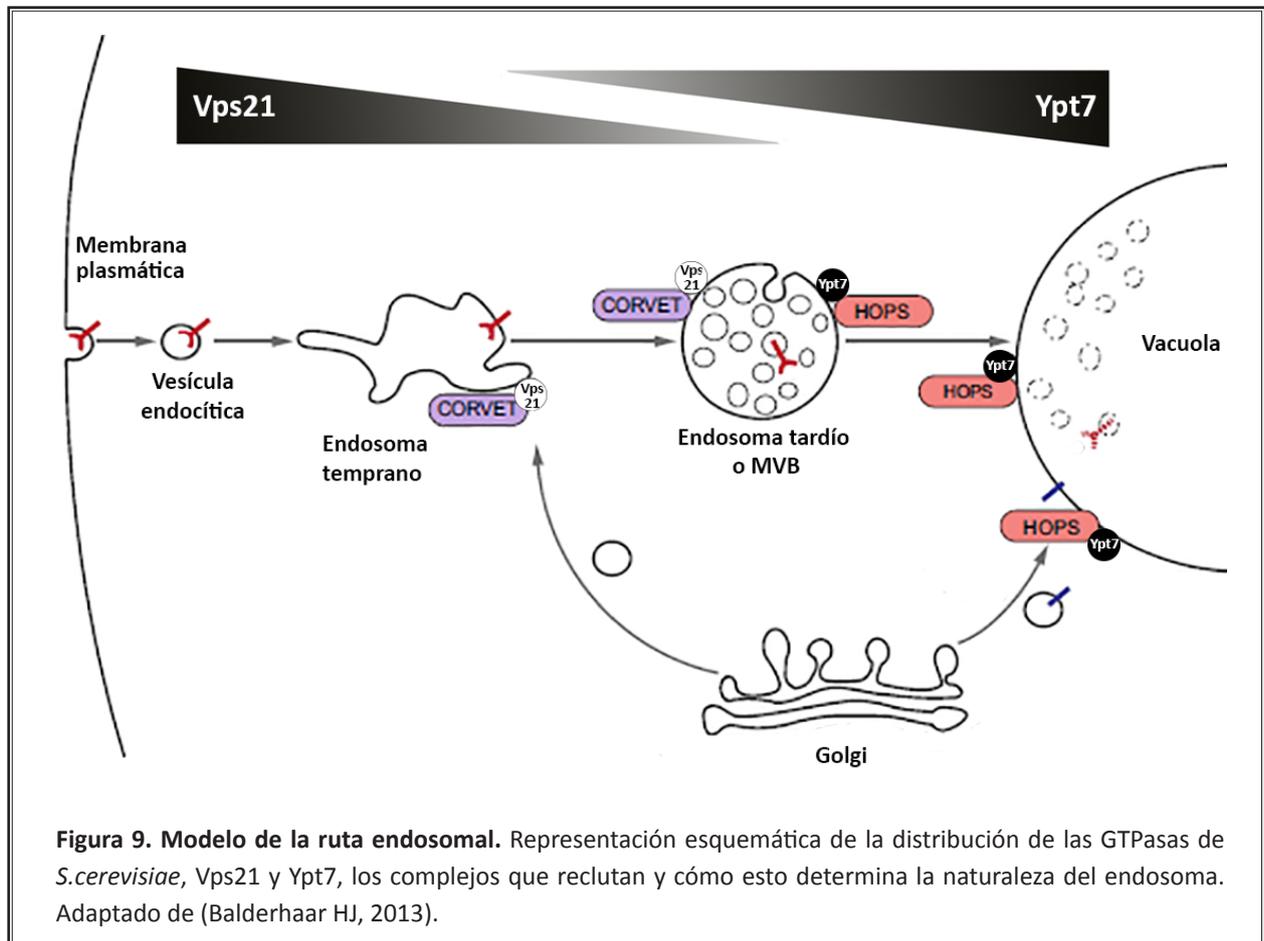
Resulta complejo asignar una función específica a los compartimentos endosomales debido a la naturaleza dinámica de esta ruta. Sin embargo, los endosomas han sido nombrados tradicionalmente de acuerdo a su relación espacio-temporal con la MP. Así, los endosomas tempranos son aquellos que se generan de la fusión de las vesículas endocíticas, mientras que los endosomas tardíos ya han sufrido varias rondas de clasificación, destinadas a dirigir sus proteínas cargo al TGN o la MP, y en última instancia se fusionarán con la vacuola. La localización espacial de los endosomas en la célula está regulada a través de su interacción con el citoesqueleto de microtúbulos y por la acción de kinesinas y dineínas, que actúan como motores con la ayuda de otras proteínas accesorias. Los endosomas tempranos normalmente se extienden por el citoplasma, mientras que los endosomas tardíos se concentran hacia la región perinuclear (Seaman, 2008).

Para que la clasificación de los cargos en los diferentes compartimentos sea eficiente cada membrana ha de tener una identidad definida. Un factor importante es la presencia de diferentes formas fosforiladas del fosfatidilinositol. La ruta endocítica, incluyendo las vacuolas, se caracteriza por la presencia del PI3P, por el contrario, el PI4P es necesario para la función del Golgi y al mismo tiempo es un marcador de sus membranas. El balance entre estos dos fosfoinosítidos es mantenido por kinasas, como la PI4-kinasa Pik1, y fosfatasas, como la PI-fosfatasa Sac1. Las PI-fosfatasas también están implicadas en el correcto funcionamiento de los endosomas tempranos, posiblemente al eliminar el PI4,5P2 adquirido de la MP durante la endocitosis. Las proteínas tienen dominios de reconocimiento específicos para estos lípidos, y de esta manera, las proteínas implicadas en la ruta endocítica pueden distinguir fácilmente las membranas endosomales de las del Golgi (Pelham, 2002).

En levaduras, las GTPasas de la familia Rab (Ras-related in brain) coordinan el tráfico intracelular regulando rutas específicas. En *S.cerevisiae*, Vps21 (también denominado 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 en mamíferos. Se considera 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 desacoplamiento de una GTPasa por otra (Spang, 2009). Vps21 recluta el complejo amarra CORVET, que promueve la fusión de los endosomas con las vesículas endocíticas (Brocker et al., 2010; Epp et al., 2011). CORVET es además capaz de reclutar el activador de Ypt7, marcando el paso de endosoma temprano a endosoma tardío. A continuación Ytp7 activo recluta a su efector, el complejo de anclaje HOPS. Este complejo determinará la fusión del endosoma tardío con la vacuola. También se ha definido a Ypt7 como el regulador del reclutamiento del retrómero, lo que hace suponer un papel integrativo de esta Rab, ya que equilibra el reciclaje con la degradación (**Figura 9**) (Balderhaar et al., 2010; Liu et al., 2012).

La fusión de las vesículas, una vez en la cercanía de las membranas, se lleva a cabo 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 estas dos proteínas provoca un acercamiento de las dos

membranas, liberando además la energía necesaria para promover su fusión. Después, los complejos de SNAREs formados son liberados quedando disponibles para un nuevo evento de fusión. (Risselada and Grubmuller, 2012). En *S.cerevisiae* este complejo está constituido por las v-SNAREs Snc1 y Snc2 y las t-SNAREs Tlg1, Tlg2 y Vti1 (Bonifacino and Rojas, 2006).



5.2. Reciclado de proteínas de membrana.

El transporte retrógrado entre endosomas y TGN permite el reciclaje de proteínas de membrana implicadas en un amplio rango de procesos biológicos, previniendo este reciclaje la degradación de estas proteínas en la vacuola. Sin embargo, este transporte está limitado a una serie de proteínas entre las que se encuentran SNAREs, como Snc1 (Chen et al., 2005) y Tlg1 (Lewis et al., 2000); las proteasas Ste13 (Foote and 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); la permeasa general de amino ácidos Gap1 (O'Donnell et al., 2010); la permeasa de arginina Can1 (Shi et al., 2011); y la quitín sintasa Chs3 (Valdivia et al., 2002). El reciclaje de algunas de estas proteínas es constitutivo y asociado a su propia función, como es el caso de las SNAREs, mientras que en otros casos el reciclaje es regulado. Así ocurre con el complejo transportador de hierro Ftr1-Fet3, de Gap1 o de Can1, cuyo reciclaje depende de la concentración de hierro externa (Strochlic et al., 2008) o de aminoácidos (O'Donnell et al., 2010), respectivamente. El reciclaje de Chs3, sin embargo, es bastante peculiar, pues está ligado a la distribución temporal de la proteína en el cuello a lo largo del ciclo. Así mismo, y como ya se mencionó anteriormente, el reciclaje de Chs3 concentra

INTRODUCCIÓN

la proteína en un reservorio intracelular que permite una rápida respuesta frente a daños en la PC (Valdivia and Schekman, 2003).

El paso fundamental en el proceso de reciclaje es que se produzca una correcta clasificación de las proteínas, segregando aquellas cuyo destino final es la vacuola de las que van a reciclarse. Esta función la desempeñan dos componentes, las vesículas recubiertas de clatrina y el retrómero, así como una amplia variedad de adaptadores que funcionan de manera coordinada con los mismos (Figura 10).

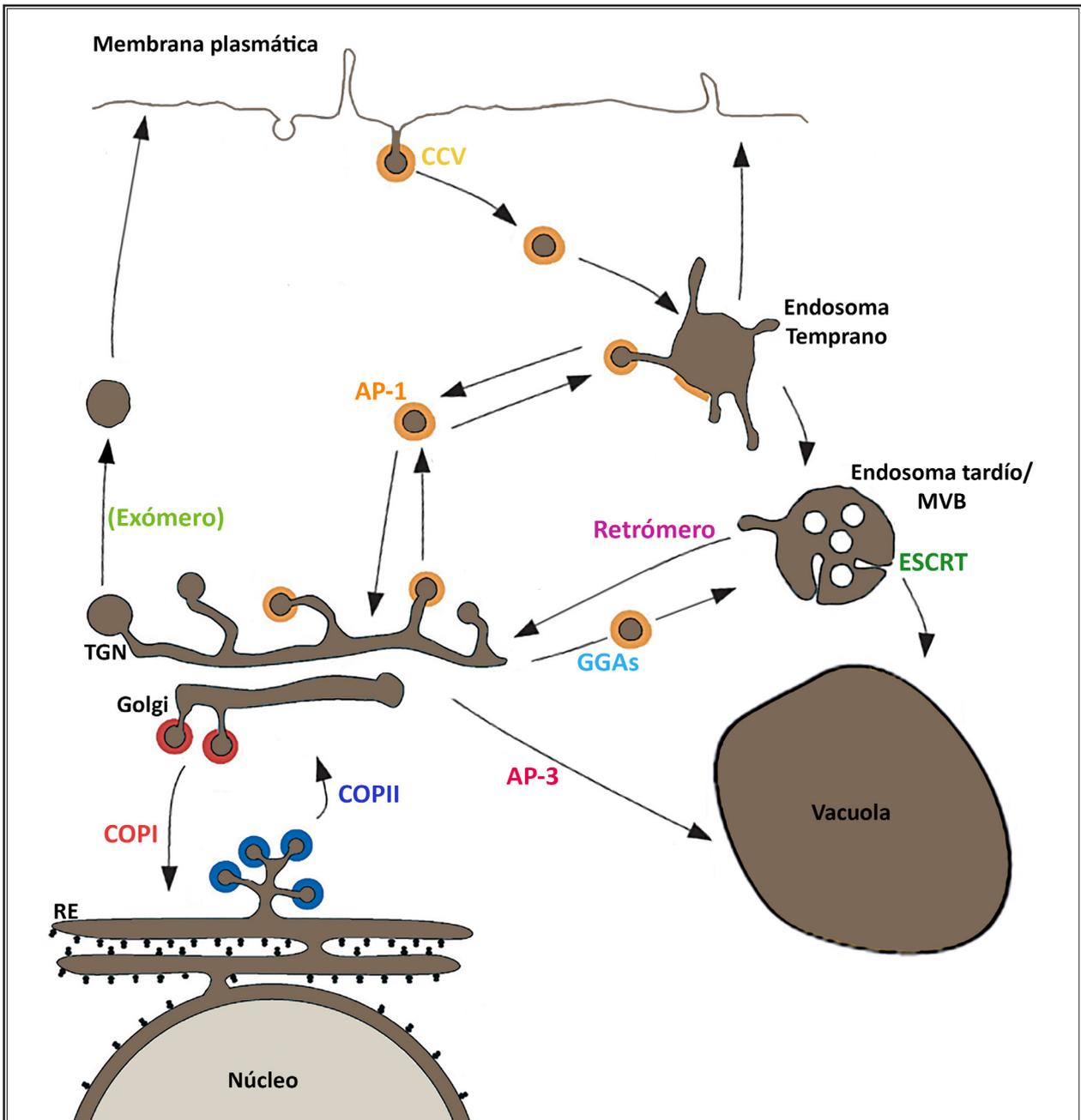


Figura 10. Esquema general de las rutas de tráfico intracelular de las proteínas de membrana. En la ilustración se muestran los distintos compartimentos celulares implicados en el transporte vesicular y los diferentes tipos de vesículas que intervienen en los procesos de secreción, endocitosis y tráfico interno entre orgánulos. Los colores marcan la distribución de los diferentes tipos de vesículas, y las flechas, las vías de transporte de dichas vesículas. Adaptado de (Bonifacino & Glick, 2004).

5.2.1. Vesículas recubiertas por clatrina y sus adaptadores.

El transporte bidireccional entre el TGN y los endosomas depende de las vesículas recubiertas por clatrina (CCVs). Estas vesículas están compuestas por moléculas de clatrina y un complejo adaptador. La clatrina carece de dominios de unión a la membrana; es por ello que necesita proteínas adaptadoras que medien su reclutamiento desde el citoplasma a la vesícula y que además interactúen con las proteínas cargo.

Clatrina

La unidad estructural de la clatrina se denomina trisquelión y está conformada por un trímero de cadenas pesadas de clatrina (Chc1) unidas por su extremo C-terminal y que a su vez se unen radialmente sobre un eje central. Sobre cada una de estas cadenas pesadas se une de forma no covalente una cadena ligera de clatrina (Clc1) (Kirchhausen and Harrison, 1981; Ungewickell and Branton, 1981). Aproximadamente 36 trisqueliones se ensamblan alrededor de la membrana generando una estructura poliédrica con caras hexagonales y pentagonales que da lugar al enrejado de clatrina que envuelve la región de la membrana donde se va a formar la vesícula. En esta estructura, las cadenas ligeras de clatrina quedan expuestas hacia el exterior de la vesícula. Por otra parte, las regiones terminales de la cadena pesada quedan libres para contactar con los diferentes adaptadores y proteínas accesorias (Fotin et al., 2004).

En levaduras la cadena ligera de la clatrina regula el ensamblaje eficiente de estas cubiertas, previniendo un mal plegamiento de las cadenas pesadas y siendo por tanto necesaria en el ensamblaje de la cubierta.

El papel principal de la clatrina es formar la cubierta de las vesículas que participan en el transporte de moléculas desde la membrana plasmática a los endosomas y en el tráfico entre diferentes orgánulos intracelulares. Además, se ha visto que contribuye de forma autónoma a la organización de los citoesqueletos de actina y microtúbulos (Chu et al., 1996).

Complejos adaptadores

Los complejos adaptadores desempeñan tres funciones generales: asociación a la membrana, unión y ensamblaje de clatrina, y selección de cargos. En *S.cerevisiae* se han descrito tres tipos de adaptadores que participan en el transporte bidireccional entre el TGN y los endosomas: el complejo AP-1, las proteínas GGA y las proteínas de tipo epsina.

Complejo AP-1

Este complejo pertenece a la familia de las adaptinas. En *S.cerevisiae* se han descrito tres complejos pertenecientes a esta familia, los complejos AP-1, AP-2 y AP-3, mientras que en mamíferos se han encontrado cinco complejos AP (AP1-5). En ambos casos únicamente AP-1 y AP-2 han demostrado ser capaces de unirse a la clatrina (Boehm and Bonifacino, 2001; de Leon et al., 2016; Hirst et al., 2011).

INTRODUCCIÓN

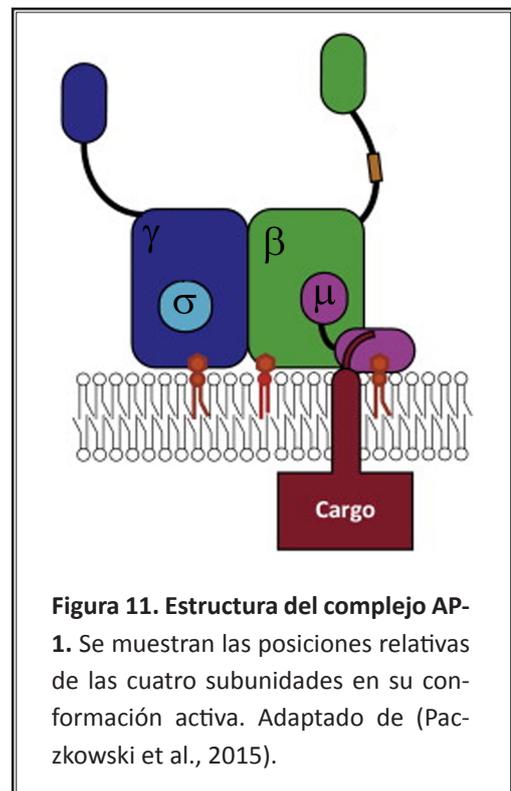
Cada uno de los complejos AP tiene distinta localización y función. El complejo AP-1 se localiza en endosomas y TGN, y está implicado en el transporte bidireccional entre estos dos orgánulos. AP-2 es el más caracterizado en células animales, donde media en la endocitosis por clatrina; si bien su función en levaduras no está tan clara, trabajos recientes también sitúan su papel en este tipo de endocitosis. Por último, AP-3 está implicado en el transporte directo entre TGN y la vacuola (Bowers and Stevens, 2005; de Leon et al., 2016; Hirst et al., 2011).

Todos estos complejos están formados por cuatro subunidades denominadas adaptinas y repartidas en dos subunidades mayores, una adaptina mediana y una pequeña. AP-1, en el caso de levaduras, está formado por dos subunidades mayores, γ (Apl4) y β (Apl2), una adaptina mediana μ 1 (Apm1/Apm2), y una subunidad pequeña σ 1 denominada Aps1 (Boehm and Bonifacino, 2001). Todos los complejos poseen una estructura similar, en la que las regiones N-terminales de las subunidades mayores forman un núcleo donde se unen las subunidades mediana y pequeña, mientras que las regiones C-terminales forman unos apéndices que se unen al núcleo a través de una región bisagra flexible. A través de esta región flexible el adaptador se une al dominio N-terminal de la cadena pesada de la clatrina, gracias a dominios específicos de reconocimiento (Fotin et al., 2004) (**Figura 11**).

AP-1 es reclutada a la membrana del TGN o los endosomas a través de su interacción con la GTPasa Arf1, el PI4P y las proteínas cargo. La unión a Arf1 es suficiente para estabilizar la conformación abierta de AP-1, estado que permite la unión simultánea del adaptador con sus tres ligandos: Arf1, el cargo y las membranas enriquecidas en PI4P. Esto constituye un mecanismo regulatorio que asegura que el complejo no interacciona con el cargo hasta que no está correctamente ensamblado en la membrana (Paczkowski et al., 2015).

En levaduras el complejo AP-1 media la recuperación desde endosomas de Kex2 (Ha et al., 2003), Tlg1 (Yeung and Payne, 2001), Chs3 (Valdivia et al., 2002), Ste13 (Footte and Nothwehr, 2006), Gap1 (O'Donnell et al., 2010), Pin2 (Ritz et al., 2014) y 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 funcionamiento del propio complejo adaptador (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 TGN/endosomas.

De los tres complejos AP de *S.cerevisiae*, sólo AP-1 alterna entre subunidades. Las dos formas existentes de AP-1 comparten las mismas subunidades mayores y pequeña, pero incorporan diferentes subunidades medianas: Apm1 o Apm2. Se ha descrito recientemente que mientras que la forma clásica de AP-1, con la subunidad Apm1, participa en el transporte de los cargos Chs3 o Snz2, la forma con la subunidad



Apm2 recicla la SNARE Snc1. Así se postula que las dos formas se encuentran presentes en la misma vesícula, pero reconocen diferentes cargos (Whitfield et al., 2015).

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

Son adaptadores monoméricos, originalmente identificados por poseer un dominio homólogo al complejo AP-1. Existen tres GGAs en mamíferos (GGA1, GGA2 y GGA3) y dos en levaduras (Gga1 y Gga2), con arquitectura similar y probablemente con funciones análogas. Todas están constituidas por tres dominios unidos en tándem y denominados VHS (Vps27, Hsr, Stam), GAT (GGA y TOM (target of myb)) y GAE (γ -adaptin ear) que están separados por dos secuencias conectoras.

En mamíferos el dominio VHS constituye el módulo de reconocimiento y unión del cargo. Sin embargo, en levaduras, esta región no presenta la función de reconocimiento, y los residuos responsables de coordinar la unión no están conservados. Este dominio continúa con una región conectora, rica en prolina, que lo une a la siguiente región, el dominio GAT. Es por este dominio GAT por el que las GGAs interactúan con la forma activa de la GTPasa Arf1, permitiendo su reclutamiento al TGN. En *S.cerevisiae*, además se ha visto que los dominios VHS y GAE cooperan para dirigir la localización de las GGAs. Además, en levaduras, este dominio es capaz de unir ubiquitina, siendo el responsable del reconocimiento de cargos, como ocurre para el transportador de amino ácidos Gap1 (Scott et al., 2004). La siguiente región es la secuencia bisagra, que se postula participa en el ensamblaje de la clatrina. Finalmente encontramos el dominio GAE, que se caracteriza por su homología al dominio “ear” de la subunidad γ del complejo AP-1. Esta zona interactúa con proteínas accesorias, como Ent3 y Ent5 en *S.cerevisiae* (Bonifacino, 2004).

La delección conjunta de *GGA1* y *GGA2* en levaduras afecta al transporte desde TGN a endosomas tardíos de las proteínas CPY (carboxipeptidasa Y), CPS (carboxipeptidasa S), Pep12, Kex2 y de la permeasa Gap1, siendo en este caso dependiente de ubiquitinación. Gga2 también interviene en el tráfico del transportador del ferrocromo Arn1, de nuevo regulado por ubiquitinación (Deng et al., 2009). Así, hasta el momento se postula que las Ggas de levadura intervienen en el transporte de proteínas de membrana a la vacuola, aunque el lugar exacto y el mecanismo de acción se desconocen (Bonifacino, 2004).

Proteínas de tipo epsina: Ent3 y Ent5.

Las proteínas de tipo epsinas son proteínas citoplasmáticas reclutadas a la membrana a través de dominios específicos. Ent3 posee un dominio ENTH (epsin N-terminal Homology), tres regiones de unión “ γ -ear” y en su región C-terminal una secuencia con baja homología a la secuencia consenso de unión a clatrina. Ent5 presenta un dominio ANTH (AP180 N-terminal Homology) en la región N-terminal, seguido de una región C-terminal con dos dominios de unión “ γ -ear” y dos regiones consenso de unión a clatrina. Ambos dominios, ENTH y ANTH, se unen eficientemente al PI(3,5)P₂ y al PI(4,5)P₂ (Duncan and Payne, 2003).

Ent3 y Ent5 fueron inicialmente identificadas por su interacción con los adaptadores AP-1 y GGA. Sin embargo, tienen funciones más generales a nivel de TGN y endosomas. Así, el mutante doble *ent3 Δ ent5 Δ* presenta varios defectos en el tráfico Golgi-endosomas de algunas SNAREs y carboxipeptidasas vacuolares

INTRODUCCIÓN

(CPS y CPY), en el tráfico a través de la ruta del cuerpo multivesicular de cargos ubiquitinados y en el tráfico retrógrado de endosomas a Golgi de cargos específicos como Snc1, la casein kinasa Yck2 o Chs3 (Copic et al., 2007). 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., 2004).

Las diferencias en los dominios y motivos, sin embargo, sugieren una divergencia en la función de estas proteínas. En apoyo de esta idea, ensayos de coimmunoprecipitación han revelado una capacidad de unión diferente a clatrina y otros adaptadores. Así, Ent5 es capaz de asociarse a clatrina, AP-1 y Gga2, mientras que Ent3 sólo presenta una robusta interacción con Gga2 (Duncan and Payne, 2003). Además, se ha visto que Ent3 actúa principalmente en el transporte desde TGN mediado por las GGAs, y que es capaz de interactuar con los SNAREs endosomales Vti1, Pep12 y Syn8 a través de su región ENTH. Ent5, por su parte, presenta interacción con Chs3, aunque ambas proteínas participan en su tráfico (Copic et al., 2007; Morvan et al., 2015).

Existe una compleja red de interacciones entre todos estos adaptadores, tanto físicas como de solapamiento de funciones. Esto hace que elucidar la función específica de cada uno de ellos sea muy complejo. Mediante un análisis detallado de la colocalización y dinámica de estas proteínas, se ha establecido que estos adaptadores se reclutan de manera secuencial sobre la misma vesícula en dos olas coordinadas en el tiempo y señalizadas por una concentración creciente de PI4P generada por la kinasa Pik1. Así, en primer lugar se recluta a la membrana del TGN Arf1, la GTPasa requerida para la formación de la cubierta de clatrina, y Pik1. Arf1 y los niveles moderados de PI4P sintetizados por la kinasa permiten el reclutamiento de Gga2. Esto desencadena una retroalimentación positiva, ya que Gga2 a su vez recluta más Pik1, incrementando los niveles locales de PI4P y con ellos, de nuevo, los de Gga2. Gga2 a su vez, es capaz de interactuar con Ent3, que se une a los SNAREs que marcarán la membrana de destino con la que se fusionará la vesícula. El incremento de los niveles de PI4P provoca la segunda ola de reclutamiento, incorporándose ahora los adaptadores AP-1 y Ent5 (Daboussi et al., 2012).

5.2.2. Retrómero.

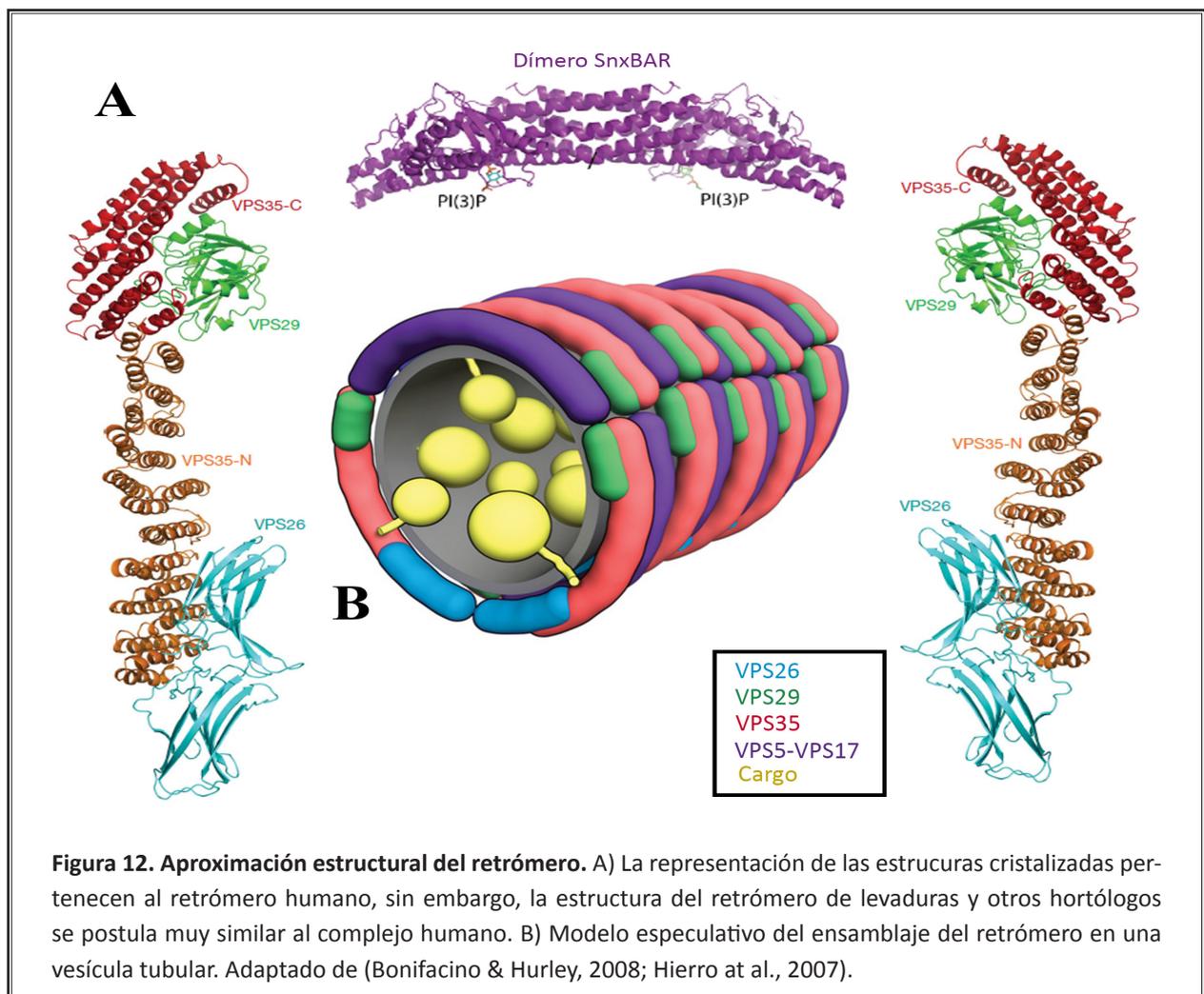
El retrómero es un complejo proteico que media el transporte retrógrado de endosomas a TGN y está conservado en todos los organismos eucariotas. Su función se describió por primera vez en levaduras, donde media el transporte retrógrado del receptor vacuolar Vps10. También se ha descrito una función análoga en células animales, recuperando, entre otros, el receptor de la manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPI). Otras proteínas cargos del retrómero en levaduras son las proteasas Kex2 y Ste13, Yif1, la dipeptil aminotransferasa (DPAP A), el transportador de hierro Fet3-Ftr1 y Can1 (Collins, 2008; Shi et al., 2011; Strohlic et al., 2008). Trabajos más recientes en mamíferos también relacionan el retrómero con el transporte polarizado de algunos cargos; así su función es requerida para el mantenimiento del receptor TGF- β II en la membrana basolateral, en la transcitosis basolateral a apical del receptor de inmunoglobulina polimérica en células epiteliales polarizadas y en el tráfico de los Crumbs determinantes de polaridad a la superficie apical de células endoteliales (Bonifacino, 2014).

El retrómero se puede diseccionar en dos subcomplejos: uno formado por las proteínas Vps35, Vps29 y Vps26, que es el responsable del reconocimiento del cargo, y otro compuesto por el dímero Vps5-Vps17,

que tiene un papel estructural. Vps35 interacciona con las proteínas cargo. Además, es la plataforma sobre la que se ensamblan el resto de componentes. Vps29, la proteína más pequeña, es a su vez esencial en el ensamblaje del retrómero, ya que media la interacción entre Vps35 y el dímero Vps5-Vps17. Vps26, por su parte, interacciona con Vps35 para promover la asociación de esta última con la membrana, y además facilita la interacción de Vps35 con Vps5-Vps17 (Seaman, 2005).

Vps5 y Vps17 son ambos miembros de la familia Snx (Sorting Nexin), definida en parte por la presencia de un dominio de homología Phox (PX) que une el PI3P, y por un dominio BAR que media la tubulación de la membrana endosomal. Las interacciones de este dímero (SnxBAR) han sido estudiadas en detalle: Vps5 interacciona con el subcomplejo Vps35-Vps29-Vps26 a través de su extremo N-terminal, mientras que su extremo C-terminal media la interacción con Vps17. Ambas proteínas contienen regiones “coiled-coil” que median la interacción entre ellas (Seaman, 2005) (**Figura 12**).

El retrómero se encuentra asociado periféricamente a las membranas endosomales. El reclutamiento de los subcomplejos ocurre de manera concomitante a la selección del cargo mediada por el trímero de reconocimiento. De manera simultánea, el dímero Snx-BAR se ensambla promoviendo la formación de estructuras tubulares de membrana endosomal en los que se incluyen los cargos. Después de la tubulación, las proteínas del retrómero se disocian de la membrana quedando preparadas para una nueva ronda. El



INTRODUCCIÓN

reclutamiento del dímero Snx-BAR depende de su unión al PI3P, a través del dominio Phox presente en las dos proteínas que lo conforman, y de un grado de curvatura específico en la membrana. Sin embargo, ninguna de las proteínas que conforma el complejo de selección del cargo posee dominios de interacción con lípidos. Es la GTPasa Ypt7 la responsable del reclutamiento del trímero de reconocimiento (Seaman, 2012). Además de Ypt7, la proteína Snx3 también está implicada en el reclutamiento de este subcomplejo (Liu et al., 2012). Snx3, a diferencia de otras proteínas de su misma familia, no contiene un dominio BAR, pero sí el dominio Phox que permite su asociación al PI3P. De esta manera, el requerimiento de Ypt7 y Snx3 para el reclutamiento de la subunidad de selección de cargo sitúa, en el caso de *S.cerevisiae*, el lugar de acción del retrómero en una región discreta del sistema endocítico, donde ambas están presentes y normalmente identificada con los endosomas tardíos (Seaman, 2012).

Estudios en células de mamíferos han revelado que la mayor parte de los cargos interactúan con el retrómero a través de un motivo citoplasmático conservado, [FW]L[MV], pero todavía queda por determinar cómo se produce este reconocimiento. Además, la palmitoilación reversible de estos cargos parece también un requisito necesario; se postula que reduciría la libertad de movimiento de esta región citoplasmática favoreciendo la interacción con el retrómero (Mukadam and Seaman, 2015). Sin embargo, no todos los cargos del retrómero poseen estas características; quedan por elucidar otras señales que medien esta interacción. En levaduras, se ha descrito que Snx3 también participa como adaptador de cargos, como ocurre en el caso del transportador de hierro Fet3-Ftr1 (Stochlic et al., 2008).

Un punto que todavía no está claro es la participación de la clatrina en el funcionamiento del retrómero. Se han detectado vesículas recubiertas de clatrina cercanas a los lugares donde se localiza el retrómero, y estudios proteómicos han identificado componentes del retrómero en preparaciones semi-puras de vesículas recubiertas de clatrina. Sin embargo, un estudio reciente concluía que el retrómero y la clatrina están presentes en distintos intermediarios. Tampoco hay estudios que demuestren la interacción de la clatrina con ningún componente de los dos subcomplejos, aunque sí se ha visto asociada a Snx3 (McGough and Cullen, 2011; Seaman, 2012). Una de las posibilidades que se proponen para explicar estos resultados es que el retrómero recupere proteínas desde los endosomas tardíos, mientras que la clatrina sea la responsable del reciclaje desde los endosomas tempranos. No obstante, también es posible que estas dos maquinarias puedan actuar en tándem. Así, inicialmente la cubierta de clatrina (reclutada probablemente por el complejo AP-1) concentraría de manera específica ciertas proteínas para favorecer posteriormente su incorporación en los túbulos de membrana formados por el retrómero (McGough and Cullen, 2013; Popoff et al., 2009).

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

5.3. Degradación de proteínas transmembranales: el camino hacia la vacuola.

Una alternativa al reciclado de las proteínas de membrana la constituiría su transporte a la vacuola, el último eslabón en la vida de una proteína de membrana antes de su degradación. Las proteínas provenientes de la ruta endocítica pasarán de los endosomas tempranos a los endosomas tardíos a través de su proceso de maduración, y de estos a la vacuola, al fusionarse el endosoma ya maduro con esta. Existe además un transporte directo para algunas proteínas desde TGN a la vacuola sin pasar por la MP.

5.3.1. Ruta endocítica a la vacuola: ruta del cuerpo multivesicular.

Para que tenga lugar la degradación vacuolar, las proteínas de membrana tienen que internalizarse en el lumen del endosoma a través de un complejo proceso de vesiculación conocido como biogénesis del cuerpo multivesicular (Multivesicular body o MVB). Los cuerpos multivesiculares son el resultado de la internalización de la membrana del endosoma hacia el lumen del mismo, llevando consigo las proteínas transmembrana. Se forman así las denominadas vesículas intraluminales (intra-luminal vesicles o ILV) en cuyo interior se encuentran los cargos. Este proceso es topológicamente inverso a otros eventos de vesiculación en los que las vesículas emergen hacia el citoplasma, como es el caso de la endocitosis mediada por clatrina o la formación de vesículas desde el TGN.

El reconocimiento de los cargos y la formación de las ILV requiere la actuación de una maquinaria especializada denominada ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), que a su vez está constituida por cinco subcomplejos proteicos altamente conservados: ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y la ATPasa Vps4. Después del reconocimiento e incorporación de los cargos en las ILVs, el cuerpo multivesicular se fusionará con la vacuola, depositando su contenido en el interior de este orgánulo, donde las proteínas serán degradadas y sus amino ácidos reciclados (MacGurn et al., 2012).

La estructura y función de los cinco complejos ESCRT ha sido sujeto de una intensa investigación y existen numerosas revisiones al respecto. Aquí se discutirá brevemente su papel y funcionamiento en el tráfico a la vacuola de proteínas de membrana (**Figura 13**).

ESCRT-0

Es el responsable del reconocimiento del cargo. Es un heterodímero formado por dos subunidades, Vps27 y Hse1 en levaduras, que interactúan en un ratio 1:1 a través de sus dominios GAT (GGAs y Tom) e *in vivo* se ensamblan como un tetrámero. Aunque las dos subunidades comparten similitudes estructurales, una de sus diferencias más notables es la existencia de un dominio de dedos de zinc FYVE en Vps27, que tiene alta afinidad por el PI3P permitiendo el reclutamiento del complejo a la membrana y confiriendo la especificidad endosomal. Ambas subunidades unen ubiquitina, lo que también participa en la especificidad por endosomas enriquecidos en cargos (MacDonald et al., 2012). Tanto la afinidad por el PI3P como la capacidad de unir ubiquitina hacen del ESCRT-0 el módulo de detección que inicia la ruta del ESCRT.

El ESCRT-0 contiene múltiples dominios de unión a ubiquitina, que como ya hemos mencionado van a participar en el reconocimiento del cargo, aunque todavía no está claro si sirven para unir varios cargos

INTRODUCCIÓN

simultáneamente, para unir con alta afinidad un único cargo o para unir cargos poliubiquitinados. Además de los dominios de unión a ubiquitina, el ESCRT-0 une los cargos a través de su interacción con la maquinaria de las vesículas de clatrina, ya que Vps27 presenta un dominio de unión a la cadena pesada de la clatrina. Otra de las funciones de este subcomplejo es la de unir y activar el ESCRT-I, paso esencial para la continuación de la ruta (Henne et al., 2011).

ESCRT-I

Formado, en levaduras, por las proteínas Vps23, Vps28, Vps37 y Mvb12. Su reclutamiento al endosoma depende del ESCRT-0, ya que su interacción con la membrana es débil y está mediada únicamente por interacciones electrostáticas. La interacción con el complejo ESCRT-0 se produce a través del extremo N-terminal de Vps23 que se va a unir a Vps27. Este subcomplejo interactúa también con el ESCRT-II mediando su reclutamiento (Henne et al., 2011).

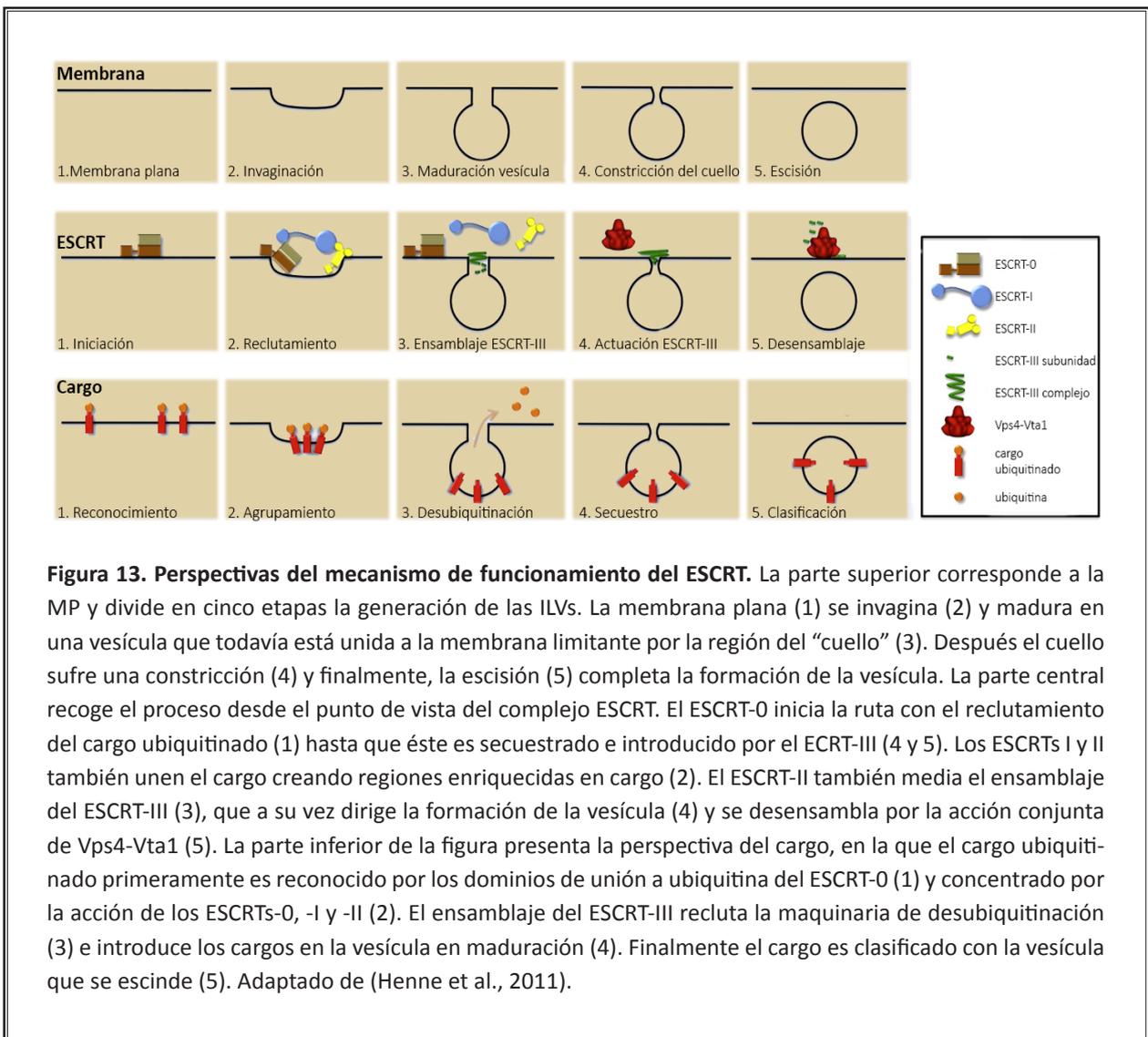


Figura 13. Perspectivas del mecanismo de funcionamiento del ESCRT. La parte superior corresponde a la MP y divide en cinco etapas la generación de las ILVs. La membrana plana (1) se invagina (2) y madura en una vesícula que todavía está unida a la membrana limitante por la región del “cuello” (3). Después el cuello sufre una constricción (4) y finalmente, la escisión (5) completa la formación de la vesícula. La parte central recoge el proceso desde el punto de vista del complejo ESCRT. El ESCRT-0 inicia la ruta con el reclutamiento del cargo ubiquitinado (1) hasta que éste es secuestrado e introducido por el ECRT-III (4 y 5). Los ESCRTs I y II también unen el cargo creando regiones enriquecidas en cargo (2). El ESCRT-II también media el ensamblaje del ESCRT-III (3), que a su vez dirige la formación de la vesícula (4) y se desensambla por la acción conjunta de Vps4-Vta1 (5). La parte inferior de la figura presenta la perspectiva del cargo, en la que el cargo ubiquitinado primeramente es reconocido por los dominios de unión a ubiquitina del ESCRT-0 (1) y concentrado por la acción de los ESCRTs-0, -I y -II (2). El ensamblaje del ESCRT-III recluta la maquinaria de desubiquitinación (3) e introduce los cargos en la vesícula en maduración (4). Finalmente el cargo es clasificado con la vesícula que se escinde (5). Adaptado de (Henne et al., 2011).

ESCRT-II

Es un heterotetrámero formado por las proteínas Vps22, Vps36 y dos subunidades de Vps25. En levaduras, el ESCRT-II interacciona con el ESCRT-I a través del dominio GLUE (GRAM-like ubiquitin-binding in EAP45) de Vps36 y el extremo C-terminal de Vps28. Este dominio GLUE también tienen la capacidad de unir ubiquitina. Al igual que el ESCRT-0, el ESCRT-II se une al PI3P, de nuevo a través del dominio GLUE, lo que contribuye a la especificidad endosomal de esta maquinaria.

Vps25 es capaz de unir la proteína Vps20 del ESCRT-III con alta afinidad, actuando así en el inicio de la formación del ESCRT-III.

ESCRT-I y ESCRT-II también contienen dominios de unión a ubiquitina. Así se pueden definir ESCRT-0, -I y -II como la maquinaria temprana responsable del anclaje específico en los endosomas y del reconocimiento de los cargos, teniendo funciones solapadas en este reconocimiento (Henne et al., 2011; MacGurn et al., 2012).

ESCRT-III

No se han descrito dominios de unión a ubiquitina en este subcomplejo, cuya función principal es la formación y escisión de las ILVs.

El ESCRT-III no existe como complejo estable preformado en el citoplasma, sino que su ensamblaje ocurre de forma progresiva en la membrana del endosoma. Está constituido por un núcleo de cuatro subunidades: Vps20, Snf7, Vps24 y Vps2. Existen monómeros de ESCRT-III en un estado cerrado y autoinhibitorio en el citoplasma. Su activación tiene lugar cuando la subunidad Vps25 del ESCRT-II une Vps20, iniciando así el reclutamiento del ESCRT-III al endosoma y la formación del complejo. Después Vps20 recluta a Snf7, que homo-oligomeriza rodeando al cargo. El ensamblaje de los oligómeros de Snf7 promueve la curvatura de la membrana y potencia la formación de las vesículas intraluminales. La oligomerización de Snf7 termina con el reclutamiento de Vps24 al complejo. Una vez en el endosoma Vps24 interacciona con Vps2, completando así el ensamblaje de este complejo y la formación de la vesícula. La afinidad electrostática de las membranas causa la constricción del cuello de las ILVs y promueve su escisión.

Snf7 también recluta a la proteína adaptadora Bro1, que da estabilidad a los filamentos de Snf7 y recluta la des-ubiquitinasa Doa4, necesaria para la des-ubiquitinación del cargo previa a su inclusión en las ILVs.

Además del núcleo de proteínas que constituyen el ESCRT-III, hay una serie de proteínas accesorias que modulan su interacción con la ATPasa Vps4. Los más estudiados son: Ist1, Did2, Vta1 y Vps60 que modulan la función de Vps4 de tres maneras: mediando la interacción de Vps4 consigo mismo, con las subunidades del ESCRT-III y promoviendo la hidrólisis del ATP (Henne et al., 2011; Henne et al., 2013).

ATPasa Vps4

El ESCRT-III necesita energía para disociarse de la membrana una vez que se ha formado la vesícula. La ATPasa de clase I Vps4 es la encargada de proporcionarla. Vps4 se une al ESCRT-III a través de su extremo

INTRODUCCIÓN

N-terminal, y esta asociación en conjunto con su multimerización promueve la hidrólisis del ATP que proporciona la energía requerida para el desensamblaje.

La delección de cualquiera de los elementos que constituyen la maquinaria del ESCRT conlleva una pérdida de función del mismo y deriva en la aparición del denominado “compartimento de clase E”, una estructura vesicular anormalmente agrandada, adyacente a la vacuola y formada por el colapso de los endosomas, que correspondería con una versión aberrante del MVB (Piper et al., 1995).

Además de su papel en la ruta hacia la vacuola, recientes estudios han demostrado la implicación del ESCRT en numerosos procesos biológicos. Así, participa en la citoquinesis de células eucarióticas, en la internalización de virus, en la secreción exosomal y en la autofagia. (Henne et al., 2011; Hurley, 2015).

5.3.2. Otros caminos a la vacuola.

Ruta CPY

Esta ruta dirige proteínas desde el TGN a la vacuola empleando los endosomas como compartimento intermediario. Su nombre lo confiere el primer cargo descrito, la Carboxipeptidasa Y (CPY). Esta proteína se sintetiza en el RE en forma de precursor que necesita ser activado en la vacuola. Cuando la CPY llega a Golgi es captada por su receptor, Vps10, y como complejo es transportada al endosoma en vesículas recubiertas por clatrina ensamblada sobre los adaptadores Gga1 y Gga2. Ya en el endosoma tardío, Vps10 se disocia de su cargo y es devuelto al TGN por el retrómero. Por su parte, la CPY es sustrato del complejo ESCRT siendo así internalizado en el MVB para posteriormente ser activada por proteólisis en la vacuola. Además de la CPY, otras proteínas que también siguen esta ruta son Kex2, Ste13, Dap12, Vph1, Pep4 y Prb1 (Bowers, 2005; Conibear and 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). Se identificó al ver que ALP era capaz de alcanzar la vacuola en los mutantes Vps (Vacuolar Protein Sorting), en los que el paso desde MVB a la vacuola está bloqueado (Cowles et al., 1997). En este transporte participa el complejo adaptador AP-3, aunque de manera independiente de clatrina (Odorizzi et al., 1998). Otras proteínas que también siguen esta ruta son la SNARE Vam3, la caseína Kinasa Yck3 y Ncr1 (Anand et al., 2009). Todas ellas se localizan en la membrana de la vacuola, lo que sugiere que la ruta AP-3, al eludir el paso por el MVB, funciona para dirigir proteínas de manera directa y selectiva a la membrana de la vacuola.

6. PAPEL DE LA UBIQUITINA EN EL TRÁFICO DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA.

Como mencionamos anteriormente, la abundancia y localización de las proteínas integrales de membrana tiene un papel crítico en el crecimiento, morfogénesis y supervivencia de las células eucarióticas. Por ello estas proteínas están sometidas a complejos procesos individuales de clasificación, tráfico y control de calidad. Un regulador clave de estos procesos es la ubiquitinación.

6.1. Ubiquitinación de proteínas.

La ubiquitinación fue inicialmente descrita como promotora de la degradación de proteínas por el proteasoma, pero desde entonces se ha demostrado su implicación en la regulación de otros múltiples procesos, incluyendo reparación del ADN, señalización y tráfico.

La ubiquitinación de proteínas es una modificación postraducciona por la que un péptido de ubiquitina de 76 amino ácidos se une covalentemente, a través de su glicina C-terminal, al grupo ϵ -amino de los residuos de lisina de la proteína diana. Este proceso es el resultado de tres reacciones enzimáticas secuenciales, catalizadas por una enzima activadora de ubiquitina (E1), una enzima conjugadora (E2) y una ubiquitina ligasa (E3), siendo además ésta última la responsable del reconocimiento del cargo (Belgareh-Touzé et al., 2008).

Las E3 ubiquitina ligasas median la adición de ubiquitina a los sustratos, determinando así el tipo y la extensión de esta modificación. Hay dos familias principales de ubiquitina ligasas: la familia RING (really interesting new gene), que se caracteriza por su unión a la enzima E2 y a los sustratos, provocando una orientación estérica óptima que permite la transferencia directa de la ubiquitina; y la familia HECT (homologous to E6-AP C terminus), que se caracteriza por aceptar la ubiquitina de la enzima E2 en residuos de cisteína propios y catalíticamente activos catalizando así la transferencia de la ubiquitina al sustrato directamente (Belgareh-Touzé et al., 2008; Clague et al., 2012).

Como la propia ubiquitina tiene varias lisinas (Lys-6, -11, -27, -29, -33, -48 and -63), puede automodificarse dando lugar a la formación de cadenas de poliubiquitina, que poseen diferentes estructuras y propiedades dependiendo de cómo se ensamblen. Está bien establecido que las cadenas de poliubiquitinación generadas por unión en la lisina K48, marcan las proteínas citosólicas para su degradación por el proteasoma, regulando su estabilidad. Sin embargo, las proteínas de membrana no son accesibles al proteasoma, por lo que las células eucarióticas han desarrollado elaborados mecanismos para monitorizar, clasificar y degradar estas proteínas. Estos mecanismos conforman parte del tráfico de proteínas de membrana y normalmente están dirigidos por señales de ubiquitinación. Existe un gran consenso en que este tráfico está gobernado por monoubiquitinación y poliubiquitinación a través de la lisina K63 (MacGurn et al., 2012).

Finalmente, la ubiquitinación es reversible y puede ser eliminada de los sustratos por unas proteasas denominadas desubiquitininasas (DUB). Existen más de 100 en el genoma humano y menos de 20 en levaduras. Esta naturaleza reversible de la ubiquitinación le confiere en parte un importante papel regulatorio en la célula (Acconcia et al., 2009; MacGurn et al., 2012).

6.2. Rsp5, la E3 ubiquitin ligasa de *S.cerevisiae*.

La familia de ubiquitina ligasas HECT incluye la subfamilia Nedd4/Nedd4-like (neural-precursor-cell-expressed, developmentally down-regulated), de las que hay nueve en humanos y sólo una en *S.cerevisiae*: la proteína esencial Rsp5.

Estas proteínas tienen una estructura modular formada por un dominio N-terminal C-2, más conocido como de unión a lípidos, de dos a cuatro dominios WW (Trp-Trp), que median la interacción proteína-proteína por la unión a un pequeño motivo de reconocimiento denominado PY ([L/P]PxY), y la región catalítica HECT en el extremo C-terminal (Belgareh-Touze et al., 2008).

Rsp5 tiene múltiples funciones, incluido un papel en la salida de mRNA o en el procesamiento de factores de transcripción. Su papel en tráfico se detalla a continuación.

6.3. Papel de la ubiquitinación en el tráfico de proteínas de membrana.

En el tráfico de proteínas de membrana, la ubiquitina participa en la regulación de numerosos procesos (**Figura 14**). En la ruta secretora, participa en la regulación de la salida de las proteínas del RE y su tráfico hasta el Golgi, en la exocitosis y en el reciclado desde los endosomas a la MP. En cuanto a los sistemas de control de calidad, marca las proteínas mal plegadas para su eliminación en la ruta ERAD (ER-associated degradation) y participa en la regulación del tráfico de Golgi a endosomas. En la ruta endosomal, la ubiquitinación está implicada en el reconocimiento y marcaje de los cargos, participa en el proceso endocítico y media el reconocimiento por el complejo ESCRT y la formación del MVB, regulando así la degradación de las proteínas de membrana en la vacuola (MacGurn et al., 2012).

Detallamos a continuación los procesos más relevantes para nuestro estudio.

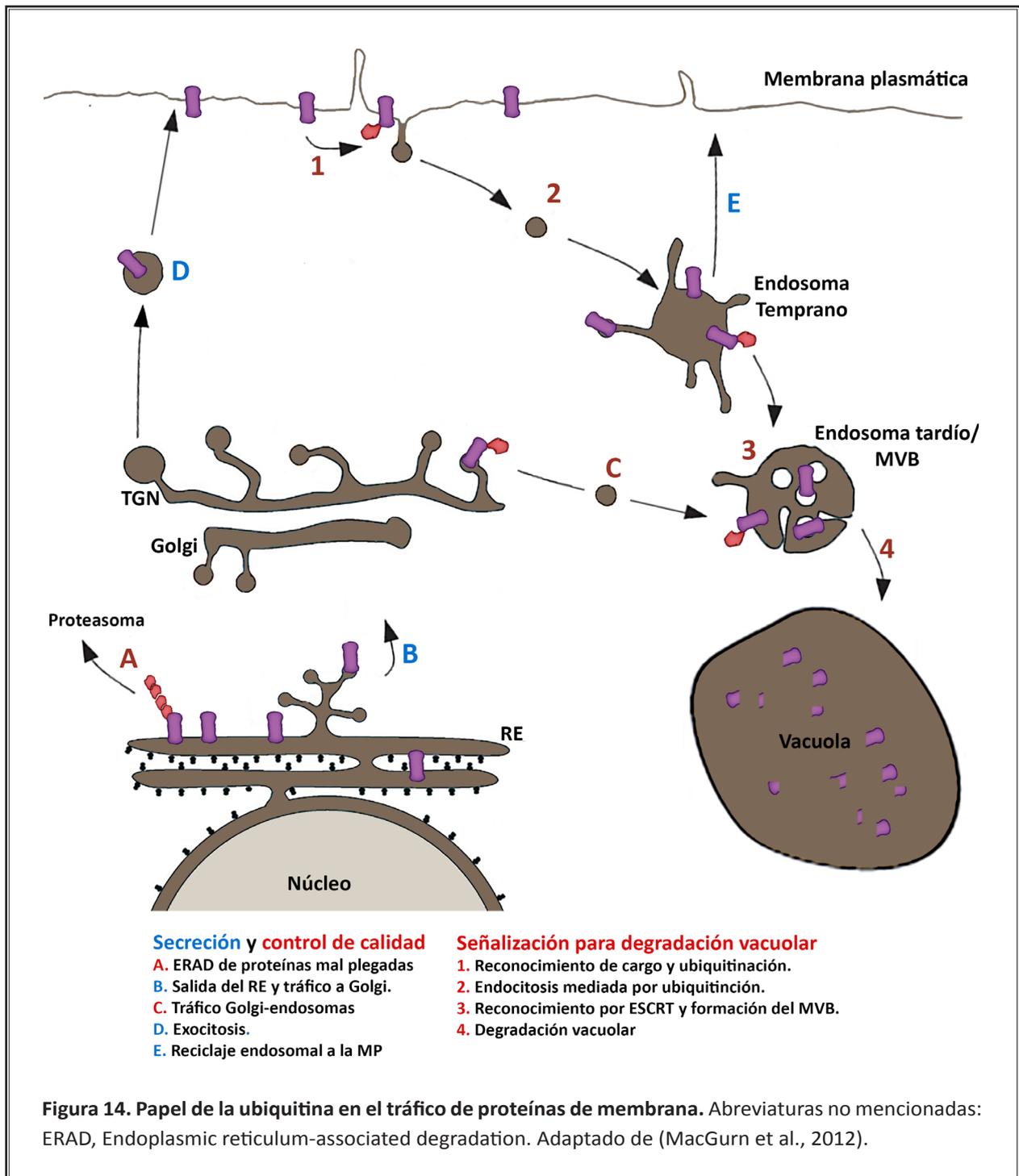
6.3.1. Tráfico de Golgi a endosomas.

En levaduras la ubiquitinación es una modificación importante para el tráfico Golgi-endosomas de proteínas que residen en la vacuola, como es el caso de la carboxipeptidasa Y (Katzmann et al., 2004). Este tráfico dependiente de ubiquitinación se ha descrito también para muchos otros cargos, incluyendo Gap1 (Risinger and Kaiser, 2008), la bomba de protones Pma1 (Liu et al., 2006), el transportador de uracilo Fur4 (Blondel et al., 2004), el transportador del sideróforo de hierro Sit1 (Erpapazoglou et al., 2008) y el transportador del ferrocromo Arn1 (Kim et al., 2007). En la mayoría de los casos Rsp5 es la ubiquitina ligasa responsable, aunque los mecanismos que regulan la selección de los cargos en el Golgi todavía se desconocen.

Cómo los cargos ubiquitinados son reconocidos y clasificados en vesículas es un proceso todavía pobremente elucidado. En la actualidad los mejores candidatos para mediar el tráfico entre el Golgi y los endosomas son los adaptadores GGAs, localizados en el Golgi y cuyo dominio GAT es capaz de unir ubiquitina. Las GGAs también interactúan con el PI4P presente en el Golgi, interacción que a su vez incrementa la afinidad del dominio GAT por la ubiquitina. Además, para muchos de los cargos que siguen esta ruta, la disrupción de la función de esta proteína resulta en fenotipos de tráfico aberrantes, como su deslocalización en la MP. Así mismo, la fusión de ubiquitina a los cargos provoca su llegada a la vacuola, de manera dependiente de las GGAs pero independiente de la endocitosis (MacGurn et al., 2012).

A pesar de esto, estudios más recientes proponen que el tráfico de Golgi a endosomas no requiere ubiquitinación, y que esta modificación sólo es necesaria para su posterior entrada en la ruta del MVB. De

acuerdo con esto, se ha visto que mutaciones que afectan la ubiquitinación de permeasas no previenen su salida de TGN hacia endosomas; en lugar de ello, la mayoría de estas proteínas se encuentran deslocalizadas en la membrana de la vacuola, mientras que otras como Gap1 o Sit1 son dirigidas desde los endosomas tardíos a la MP (MacGurn et al., 2012). Así se ha postulado, que las GGAs funcionan en la clasificación endosomal de cargos ubiquitinados junto con la maquinaria del ESCRT, como también se propone para mamíferos (Lauwers et al., 2010).



6.3.2. Endocitosis mediada por ubiquitina.

La ubiquitinación marca las proteínas que posteriormente serán reconocidas por la maquinaria endocítica. Esta endocitosis mediada por ubiquitina se vio por primera vez en levaduras con estudios en los que se demostraba el requerimiento de esta señal para la endocitosis de múltiples proteínas de MP como Ste6, Ste2, Prd5 y Fur4 (MacGurn et al., 2012). Además, para muchos de los cargos estudiados en levaduras, la ubiquitinación es necesaria y suficiente para la endocitosis, aunque también se ha descrito endocitosis independiente de ubiquitina (Chen and Davis, 2002).

La mayor parte de los cargos en levaduras están ubiquitinados en múltiples lisinas, y varias de ellas con cadenas cortas unidas por la lisina K63, el tipo de cadena que genera preferencialmente Rsp5. A pesar de esto, varios estudios concluyen que la monoubiquitinación es señal suficiente para promover la endocitosis, y que las cadenas con unión K63 son más importantes en pasos posteriores. Estas modificaciones van a ser reconocidas por la maquinaria endocítica, concretamente las epsinas Ent1 y Ent2 y la proteína Ede1 tienen dominios de unión a ubiquitina (Clague et al., 2012; Lauwers et al., 2010).

6.3.3. Reconocimiento por el complejo ESCRT y formación del MVB.

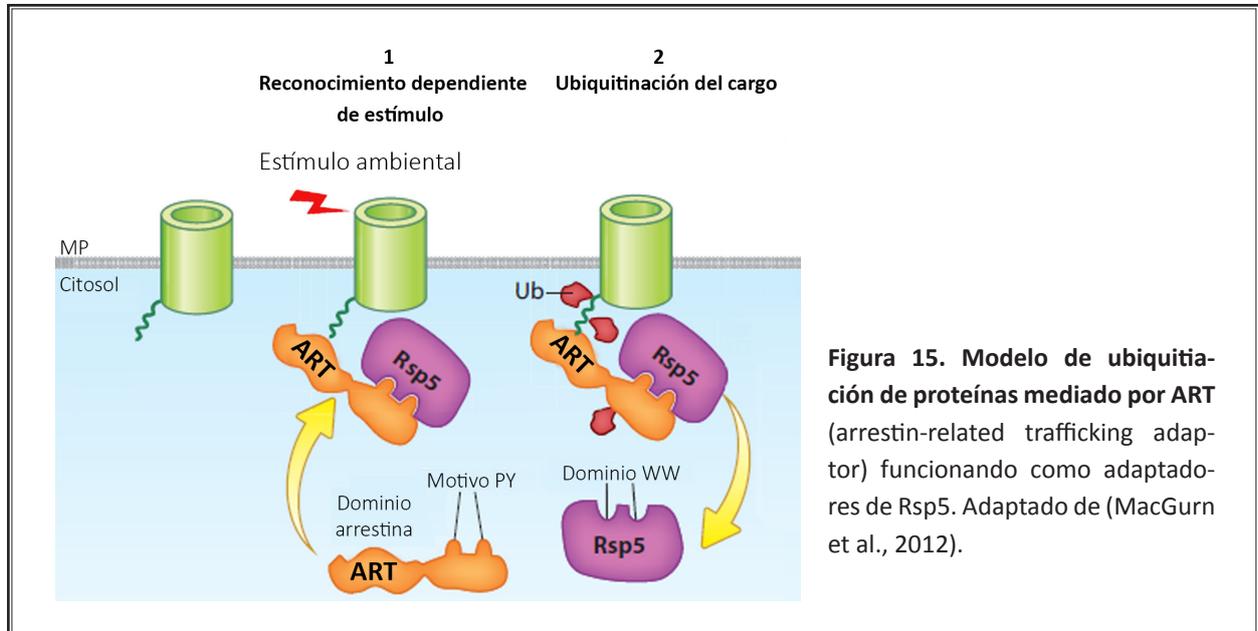
La ubiquitina es también la señal que marca las proteínas para su reconocimiento por la maquinaria del ESCRT. Como ya mencionamos anteriormente, el ESCRT-0 es el primer responsable del reconocimiento del cargo y todas sus subunidades presentan sitios de unión a ubiquitina. Además del ESCRT-0, los complejos ESCRT-I y -II también presentan dominios de unión a ubiquitina participando en el reconocimiento. Se postula que el reconocimiento por el ESCRT es un mecanismo cooperativo, en el que numerosos componentes de este supercomplejo contribuyen al reconocimiento de la ubiquitina de manera redundante (MacGurn et al., 2012).

El ESCRT reconoce con mayor afinidad las cadenas de ubiquitina unidas por las lisinas K63, aunque también se ha visto su interacción con cadenas unidas por la lisina K-48. Además, muchos de los propios componentes de este complejo se encuentran a su vez ubiquitinados, aunque esta señal no es esencial para su funcionamiento (Clague et al., 2012).

6.4. “Arrestin-related trafficking adaptors” o ART.

Como acabamos de describir, Rsp5, la única ubiquitina ligasa de la familia Nedd4 en *S.cerevisiae*, es crítica en numerosos pasos del tráfico intracelular. ¿Pero cómo una única ubiquitina ligasa es capaz de reconocer la gran variedad de sustratos sobre los que actúa? Rsp5, como ya hemos mencionado, contiene tres dominios WW que reconocen motivos PY con las secuencias típicas PPXY o LPXY. Se han descrito varias proteínas adaptadoras con estos dominios que median la ubiquitinación de proteínas particulares o grupos de proteínas (revisado en (Leon and Haguenaer-Tsapis, 2009). Estos adaptadores incluyen las proteínas de membrana Bsd2, Tre1/2, Ear1, Ssh4 y Rcr1/2, así como las proteínas solubles Bul1 y Bul2. Sin embargo, estas proteínas no se localizan en la MP, sino que forman parte de los mecanismos de regulación y control de calidad a nivel de Golgi o en pasos posteriores de la ruta endosomal. Son los adaptadores relacionados con arrestinas o ARTs (Arrestin-related trafficking adaptors) los que desempeñan esta función

a nivel de la MP, mediando la ubiquitinación de los transportadores, receptores o enzimas que se encuentran a este nivel. Estas proteínas ART contienen dominios PY que les permiten ser ubiquitinados por y unir Rsp5 (MacGurn et al., 2012 ; Nikko and Pelham, 2009) (**Figura 15**).



Las levaduras poseen ocho proteínas con una clara secuencia de arrestina y homología entre ellas, llamadas Art2/Ecm1, Art8/Csr2, Art4/Rod1, Art7/Rog3, Art6/Aly1, Art3/Aly2, Art5/Ygr068c y Art9/Rim8. Además, se suma una proteína relacionada, pero mucho más distante, Art1/Ldb9, que aun así se identifica claramente como un miembro de las proteínas ART. Para la mayoría de estas proteínas se ha demostrado su unión a Rsp5 y su ubiquitinación por ella, a excepción de Art9/Rim8. Rim8 no posee el dominio canónico PPXY y tiene un papel único en la restauración del pH, teniendo una función diferente al resto de proteínas ART (Becuwe et al., 2012a). Rim8/Art9 es esencial para la activación proteolítica del factor de transcripción en respuesta a pH, Rim101, en respuesta a pHs neutros a alcalinos (Peñalva et al., 2008). Además, tiene un papel central en la coordinación de la maquinaria del ESCRT y la cascada de señalización de pH (Herrador et al., 2010). Además, el laboratorio del Dr. Hugh Pelham identificó una proteína adicional, Ylr392c, que también encaja con las proteínas ART, aunque su relación es todavía más distante que la de Art1. Denominada Art10, posee el dominio PY y es sustrato de Rsp5 (Nikko and Pelham, 2009).

Estudios en levaduras han revelado el papel de las proteínas ART en la internalización de proteínas de la MP y su regulación a niveles posteriores en respuesta a señales del ambiente, como exceso de sustrato, nutrientes o estrés. A continuación y de forma esquematizada exponemos los cargos conocidos hasta el momento para cada una de las proteínas ART (**Tabla 1**).

El requerimiento de múltiples adaptadores para un mismo cargo puede reflejar la necesidad de crear modificaciones específicas, proveer ubiquitinación en diferentes etapas de la ruta o simplemente alcanzar umbrales específicos de ubiquitinación.

ART	CARGO					
Art1/Ldb1	Can1 ^{5,6,7}	Fur4 ⁷	Mup1 ⁷	Lyp1 ⁷	Tat2 ⁷	Ste2 ¹
Art2/Ecm21	Smf1 ⁷	Fur4 ⁷		Lyp1 ⁷	Tat2 ⁷	
Art3/Aly2	Gap1 ^{4,8}	Dip5 ⁹				
Art4/Rod1	Hxt1 ¹⁰	Hxt3 ¹⁰	Hxt6 ⁷	Jen1 ^{2,3}		Ste2 ¹
Art5	Itr1 ⁷					
Art6/Aly1	Gap1 ^{4,5,8}					
Art7/Rog3	Hxt1 ¹⁰	Hxt3 ¹⁰				Ste2 ¹
Art8/Csr2	Smf1 ⁷	Fur4 ⁷	Hxt6 ⁷			
Art9/Rim8						
Art10						

Tabla 1. Proteínas de membrana en *S.cerevisiae* cuya ubiquitinación por Rsp5 está mediada por ART. Alvaro et al., 2014¹; Becuwe and León 2014²; Becuwe et al., 2012b³; Crapeau et al., 2014⁴; Ghaddar et al., 2014⁵; Lin et al., 2008⁶; Nikko and Pelham, 2009⁷; O'Donnell et al., 2010⁸; O'Donnell et al., 2013⁹; O'Donnell et al., 2015a¹⁰.

Finalmente, se ha descrito en levaduras un papel para las ART en la endocitosis no mediada por clatrina. Hasta ahora se sabía que estas proteínas contribuían al reconocimiento de los cargos por la maquinaria de la endocitosis mediada por clatrina al promover su ubiquitinación reclutando Rsp5. Un estudio reciente demuestra que estas mismas proteínas ART promueven la interacción con la maquinaria de endocitosis independiente de clatrina, la GTAasa Rho1 y su GEF Rom2, promoviendo también la internalización de los cargos por esta vía. Sin embargo, ni la expresión de Rsp5 ni su unión a las proteínas ART es necesaria para la endocitosis independiente de clatrina. Así concluyen, que las ART son claves en la endocitosis media por clatrina e independiente de clatrina, pero actuando en cada caso por un mecanismo diferente (Prosser et al., 2015).

6.4.1. Mecanismos de regulación de las proteínas ART.

Muchos de estos adaptadores son a su vez diana de Rsp5 y su función está regulada por señales de ubiquitinación. Por ejemplo, algunos adaptadores como Bsd2, Tre1/2, Ear1 o Ssh4 son ubiquitinados por Rsp5, consecuentemente reconocidos como cargos y llevados a la vacuola para su degradación, permitiendo así el control de los niveles de adaptadores y la disponibilidad de Rsp5. También se ha descrito este tipo de regulación para algunas de las ARTs. De esta manera, la variante no ubiquitinable de Art1 es incapaz de promover la endocitosis de Can1 (Lin et al., 2008); Rod1/Art4 es ubiquitinado en respuesta a la exposición a glucosa y un mutante no ubiquitinable es incapaz de promover la endocitosis del transportador de lactato Jen1 tras el tratamiento con glucosa (Becuwe et al., 2012b); así mismo, Art2/Ecm21 y Art8/Csr2 también se han visto asociados a la desubiquitinasa Ubp2, sugiriendo todo esto, que la función de los adaptadores está modulada por rondas de ubiquitinación y desubiquitinación, que contribuyen así a su fina regulación (Leon and Haguenaer-Tsapis, 2009).

También se ha descrito regulación por fosforilación para las proteínas ART Art4 y Art1. En el caso de Art4/Rod1 su fosforilación y ubiquitinación ocurre en respuesta a señales externas. La kinasa Snf1 y la fosfatasa PP1 controlan el estado de fosforilación de Art4 en respuesta a la disponibilidad de glucosa. Así, en ausencia de glucosa Art4/Rod1 está fosforilado y la endocitosis de los transportadores inhibida (Becuwe et al., 2012a). Sin embargo, para la regulación de Ste2 en respuesta a feromona, la función de Art4/Rod1 requiere su desfosforilación dependiente esta vez de calcineurina (Alvaro et al., 2014). Por su parte, Art1/Ldb19 es sujeto de fosfoinhibición a través de la acción del efector de TOR la proteína kinasa Npr1, permitiendo así a la célula regular la endocitosis de los transportadores de amino ácidos en función de los niveles de nitrógeno (MacGurn et al., 2011).

7. Chs3, PARADIGMA DEL TRÁFICO DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA

Como se puede extraer de esta introducción, el tráfico intracelular de las proteínas de la MP es extremadamente complejo y Chs3 parece recapitular todas sus características fundamentales, empleando los factores generales del tráfico intracelular además de poseer una serie de proteínas dedicadas exclusivamente a su tránsito por la ruta de secreción.

Chs3 se ha caracterizado por su dependencia del exómero para llegar de manera polarizada a la MP desde el TGN (Sanchatjate and Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006). Sin embargo, y como ya hemos mencionado, puede alcanzar la MP en ausencia del exómero, bien deleccionando el complejo AP-1 o previniendo su interacción con este a través de diferentes mutaciones en el extremo citosólico N-terminal de Chs3. En base a esto, se ha demostrado que AP-1 (Valdivia et al., 2002) así como las epsinas Ent3 y Ent5 (Copic et al., 2007) participan en el reciclado endosomal de Chs3 manteniendo de esta manera un reservorio intracelular entre TGN y endosomas tempranos que permite movilizar Chs3 rápidamente a la MP en diferentes fases del ciclo celular (Zanolari et al., 2011) o tras situaciones de estrés (Valdivia and Schekman, 2003). Se ha descrito un reciclado endosomal temprano para otras proteínas transmembrana, como la v-SNARE Snc1 (Chen et al., 2011) o la proteína integral de Golgi Ste13 (Foote and Nothwehr, 2006), pero el modelo de tráfico que coordina las funciones del exómero y el complejo AP-1 está restringido a un grupo limitado de proteínas altamente polarizadas que únicamente incluyen hasta la fecha Fus1 (Barfield et al., 2009), Pin2 (Ritz et al., 2014) y Flc2 (A. Spang, no publicado). Sin embargo Chs3, al contrario que estas, es una proteína politépica que comparte similitudes estructurales con muchos transportadores transmembrana, con algunos de los cuales incluso comparte una chaperona específica de RE que asegura su correcto plegamiento (Kota and Ljungdahl, 2005). En general, la función de estos transportadores no depende de su reciclado endosomal sino de su endocitosis regulada y su posterior transporte a la vacuola (Lauwers et al., 2010). Sin embargo, se ha demostrado un reciclado dependiente de retrómero para algunos transportadores de membrana de levaduras, como es el caso del transportador de hierro Ftr1 (Strochlic et al., 2008) o el de arginina, Can1 (Shi et al., 2011); incluso se ha propuesto un papel potencial del complejo AP-1 en el reciclado desde endosomas de la permeasa general de aminoácidos Gap1 en condiciones de falta de nitrógeno (O'Donnell et al., 2010).

Así, el tráfico de Chs3 parece compartir características de proteínas residentes en el sistema endosomal y de transportadores de membrana plasmática, consiguiendo de esta manera satisfacer la necesidad de que exista reservorio intracelular de Chs3 junto con su papel como enzima en la MP.

OBJETIVOS

Las levaduras son capaces de adaptarse para sobrevivir en muy diferentes situaciones, incluyendo condiciones altamente estresantes como baja disponibilidad de nutrientes, altas temperaturas, altos niveles de osmolaridad o diversos tratamientos antifúngicos. Para ello la MP fúngica es capaz de remodelarse en respuesta a estos cambios ambientales, mediante la adición o eliminación de proteínas y lípidos a través de las rutas secretora y endocítica.

El mantenimiento de la integridad celular en estas condiciones cambiantes está garantizado por la pared celular. La quitina es parte esencial de la misma, actuando como anclaje para el resto de componentes. Como ya hemos indicado, la principal Quitín Sintasa en levaduras es la QSIII, cuya subunidad catalítica es la proteína de MP Chs3. Debido a su papel fundamental en la respuesta a estrés, el tráfico intracelular de Chs3 destaca por estar finamente controlado, permitiendo así la precisa regulación de la actividad QSIII en la preservación de la integridad celular. Esta característica ha hecho de Chs3 un modelo para abordar el estudio del tráfico intracelular de PM.

El modelo actual propone que Chs3 evita su degradación en la vacuola, siendo en su lugar reciclada y manteniéndose así en un reservorio entre el TGN y los endosomas tempranos. Este reciclaje, a su vez, permite una rápida movilización de la proteína en situaciones de estrés. Sin embargo, el proceso por el que la proteína se recicla y evita su degradación todavía no está completamente elucidado. Así pues, el presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio del tráfico post-endocítico de esta proteína, así como las señales que lo regulan permitiendo a la levadura remodelar su PC en función de las condiciones ambientales.

Este objetivo se integra dentro de un proyecto global centrado en el estudio de la actividad QSIII, responsable de la síntesis de la quitina mayoritaria en la levadura *S.cerevisiae*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Chs3 VIAJA POR LA RUTA ENDOSOMAL TARDÍA O DEL MVB.

La mayor parte de Chs3 ocupa un reservorio intracelular entre el TGN y los endosomas tempranos (ET) del que es rápidamente movilizada a la MP en las diferentes etapas del ciclo celular o en respuesta a estrés (Valdivia et al., 2002; Zanolari et al., 2011; Ziman et al., 1996). En base a estas observaciones y otros trabajos previos, se llegó a la conclusión de que el complejo AP-1 era el responsable de la retención de Chs3 en este reservorio, evitando de esta manera su degradación en la vacuola (Starr et al., 2012; Valdivia et al., 2002). Sin embargo, nosotros observábamos de manera consistente una señal de Chs3-GFP en la vacuola (**Figura 16A**), cuya intensidad variaba en función de la cepa y las condiciones de crecimiento. Así, una fracción de Chs3 debía de ser transportada hasta la vacuola para su degradación, siendo el tamaño de esta fracción dependiente de las condiciones de crecimiento. Esta observación nos llevó a proponer que el destino final de Chs3, reciclado frente a degradación, debía de decidirse a nivel endosomal.

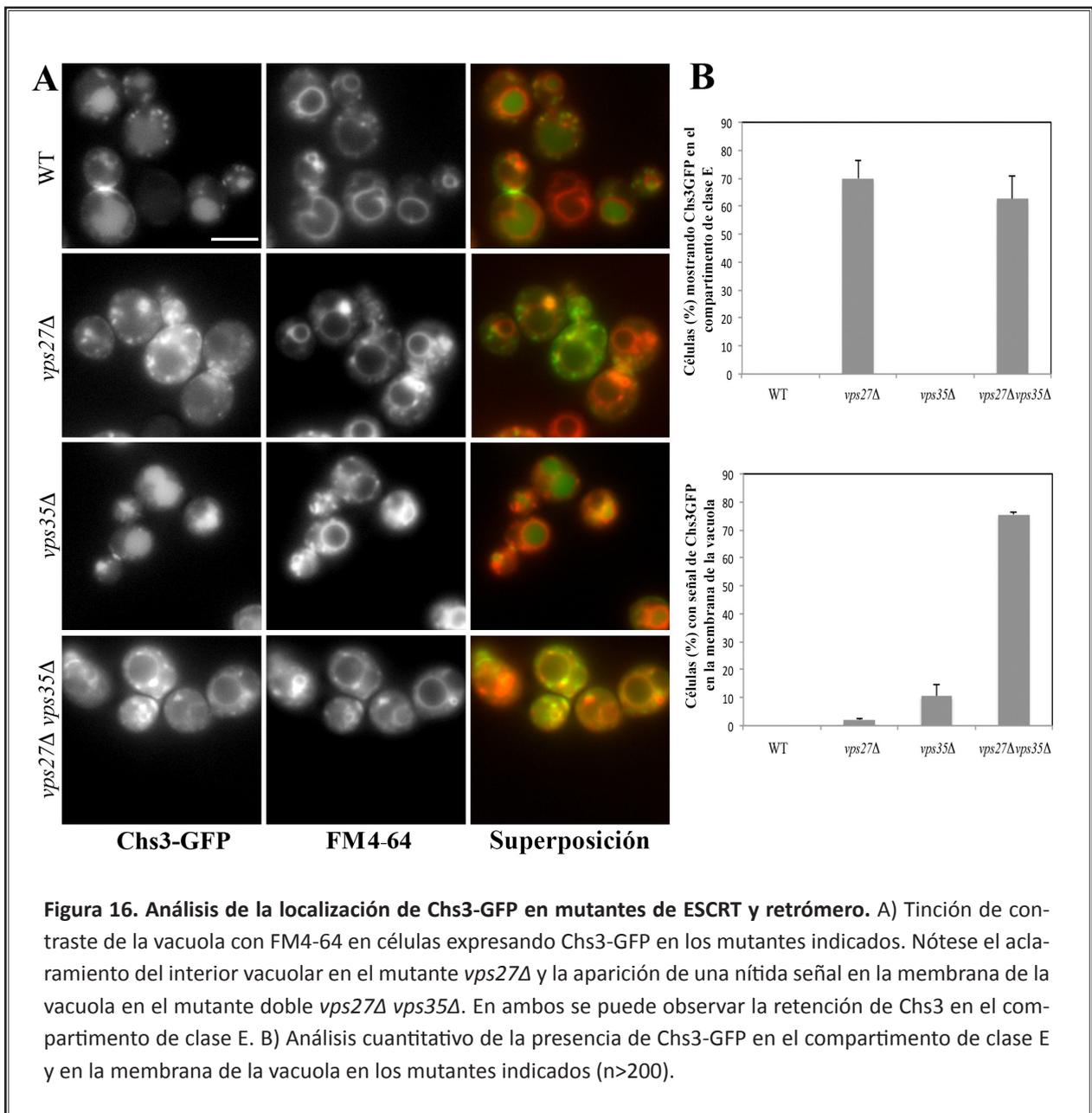
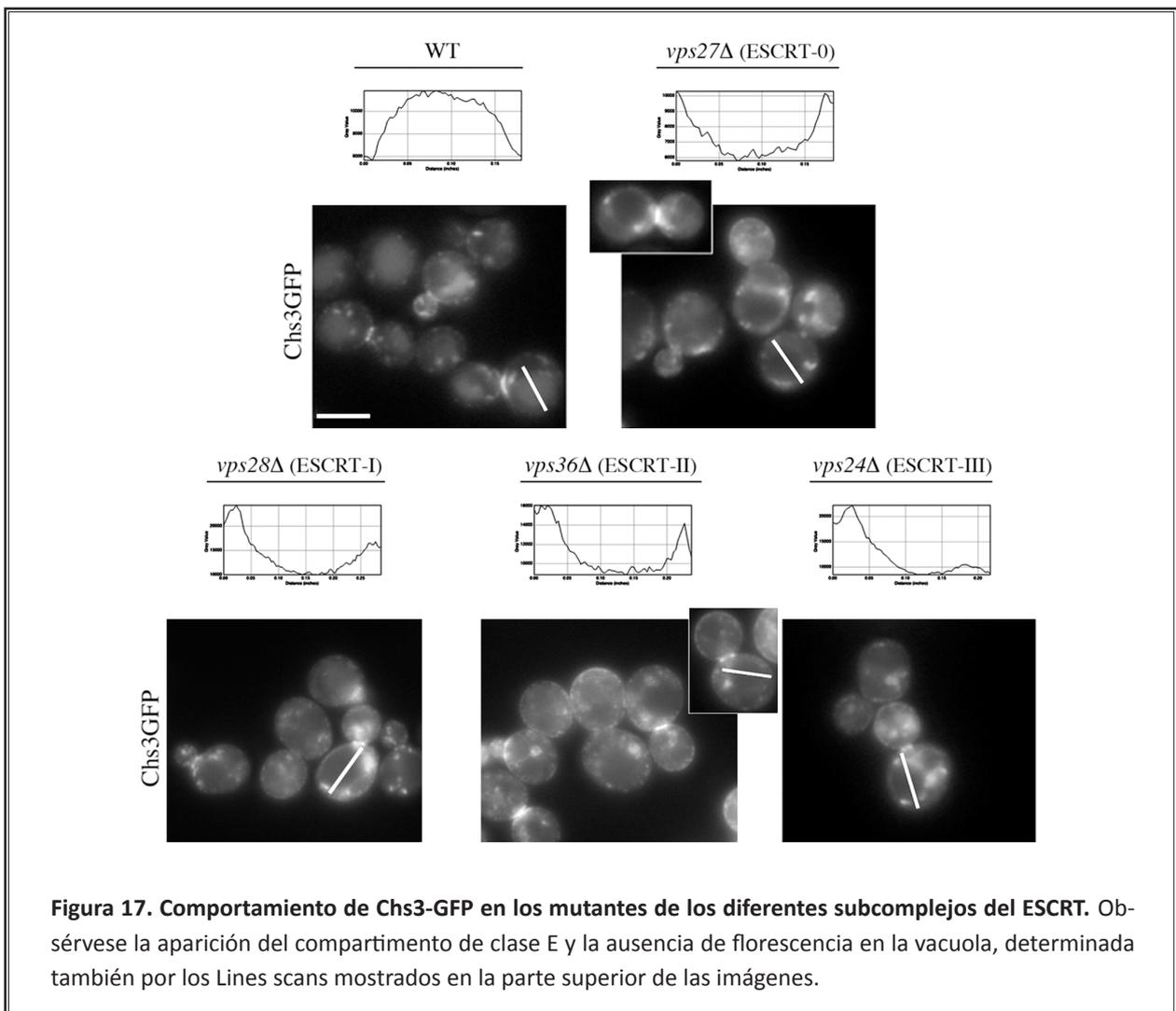


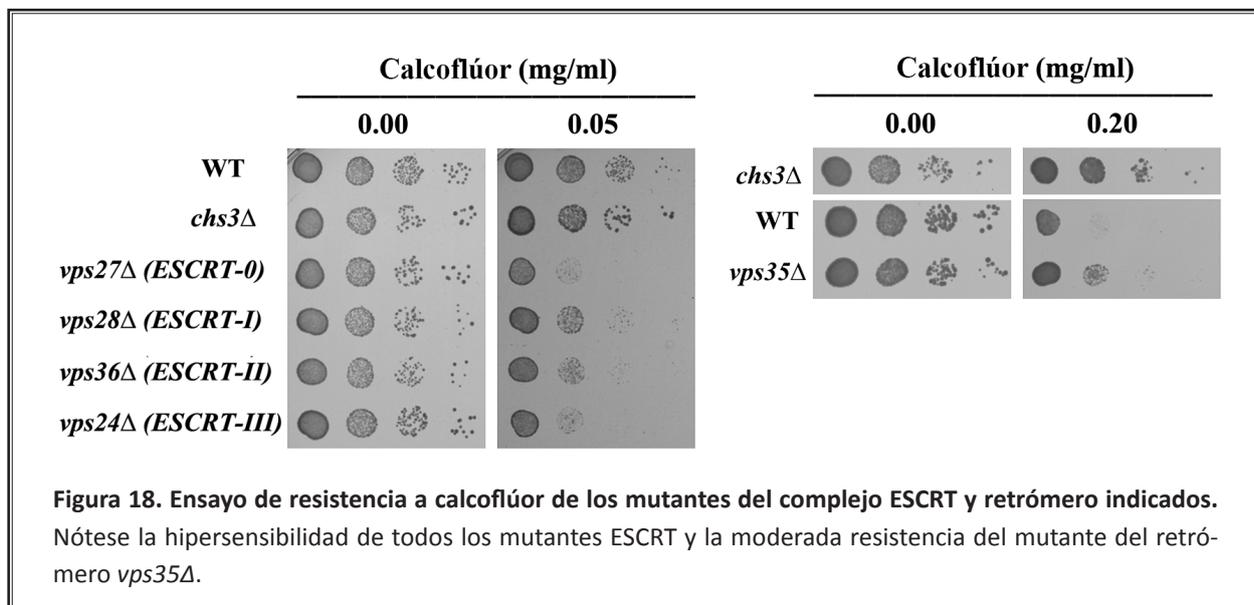
Figura 16. Análisis de la localización de Chs3-GFP en mutantes de ESCRT y retrómero. A) Tinción de contraste de la vacuola con FM4-64 en células expresando Chs3-GFP en los mutantes indicados. Nótese el aclaramiento del interior vacuolar en el mutante *vps27Δ* y la aparición de una nítida señal en la membrana de la vacuola en el mutante doble *vps27Δ vps35Δ*. En ambos se puede observar la retención de Chs3 en el compartimento de clase E. B) Análisis cuantitativo de la presencia de Chs3-GFP en el compartimento de clase E y en la membrana de la vacuola en los mutantes indicados (n>200).

1.1. Tráfico de Chs3 en mutantes del complejo ESCRT y retrómero.

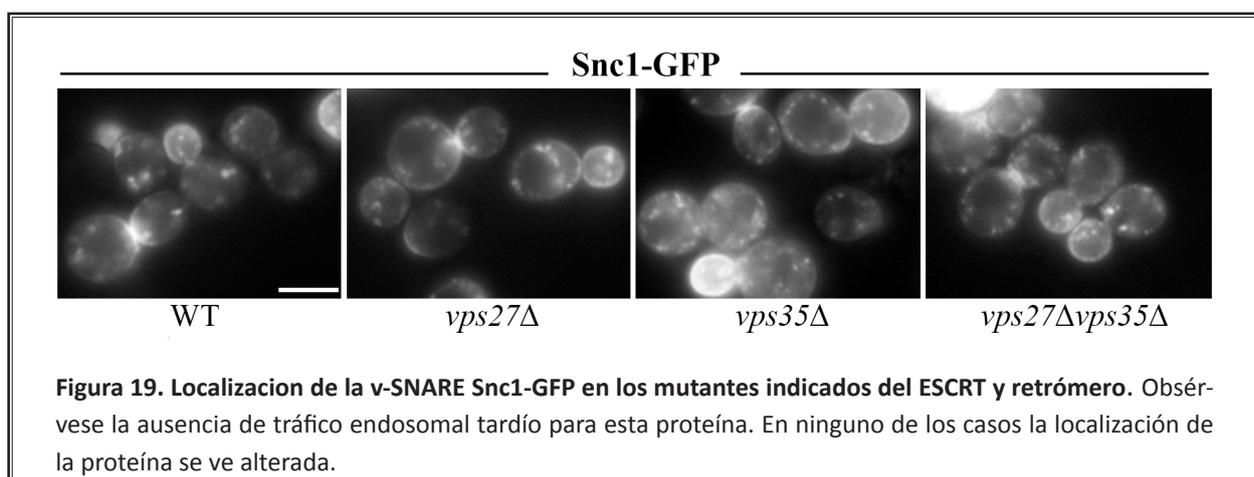
Para comprobar nuestra hipótesis primero debíamos demostrar el tráfico de Chs3 hacia la vacuola, para lo que interferimos en la biogénesis del cuerpo multivesicular (MVB). Si Chs3, como se había postulado, sólo se reciclaba entre endosomas tempranos y el TGN, su tráfico no se vería afectado en mutantes del complejo ESCRT, mientras que si una parte de la proteína sufría degradación, veríamos una alteración en su tráfico y la pérdida de la señal vacuolar. Así se observó que en el mutante *vps27Δ*, defectivo en el ESCRT-0 y por lo tanto incapaz de internalizar proteínas en el MVB, Chs3-GFP se localizaba en el cuello y vesículas intracelulares de manera similar a la cepa silvestre. Sin embargo, la mayor parte de las células (70.0 ± 6.3%) también presentaban una clara acumulación de la proteína en el previamente descrito compartimento de clase E (Raymond et al., 1992), una estructura vesicular agrandada y aberrante generada por el colapso de los endosomas (Piper et al., 1995). Además, las células mutantes apenas mostraban señal en el interior de la vacuola (**Figura 16A**). Resultados similares se obtuvieron al observar Chs3-GFP en los mutantes correspondientes a los complejos ESCRT-I, -II y III (**Figura 17**). Ninguno de los mutantes del ESCRT mostró resistencia a calcoflúor, siendo todos ellos hipersensibles en comparación con la cepa control; hipersensibilidad probablemente ocasionada por defectos pleiotrópicos de la propia mutación (**Figura 18**).



Posteriormente, analizamos la localización de Chs3-GFP en el mutante del retrómero *vps35Δ* (Seaman et al., 1997). En este caso, la señal de Chs3-GFP en la vacuola era mucho más intensa en la mayoría de las células (**Figura 16A**), un fenotipo consistente con un aumento de la degradación de la proteína. Así mismo, la cepa *vps35Δ* presentaba una moderada resistencia a calcoflúor frente al control, fenotipo compatible a su vez con una reducción de los niveles funcionales de Chs3 (**Figura 18**).



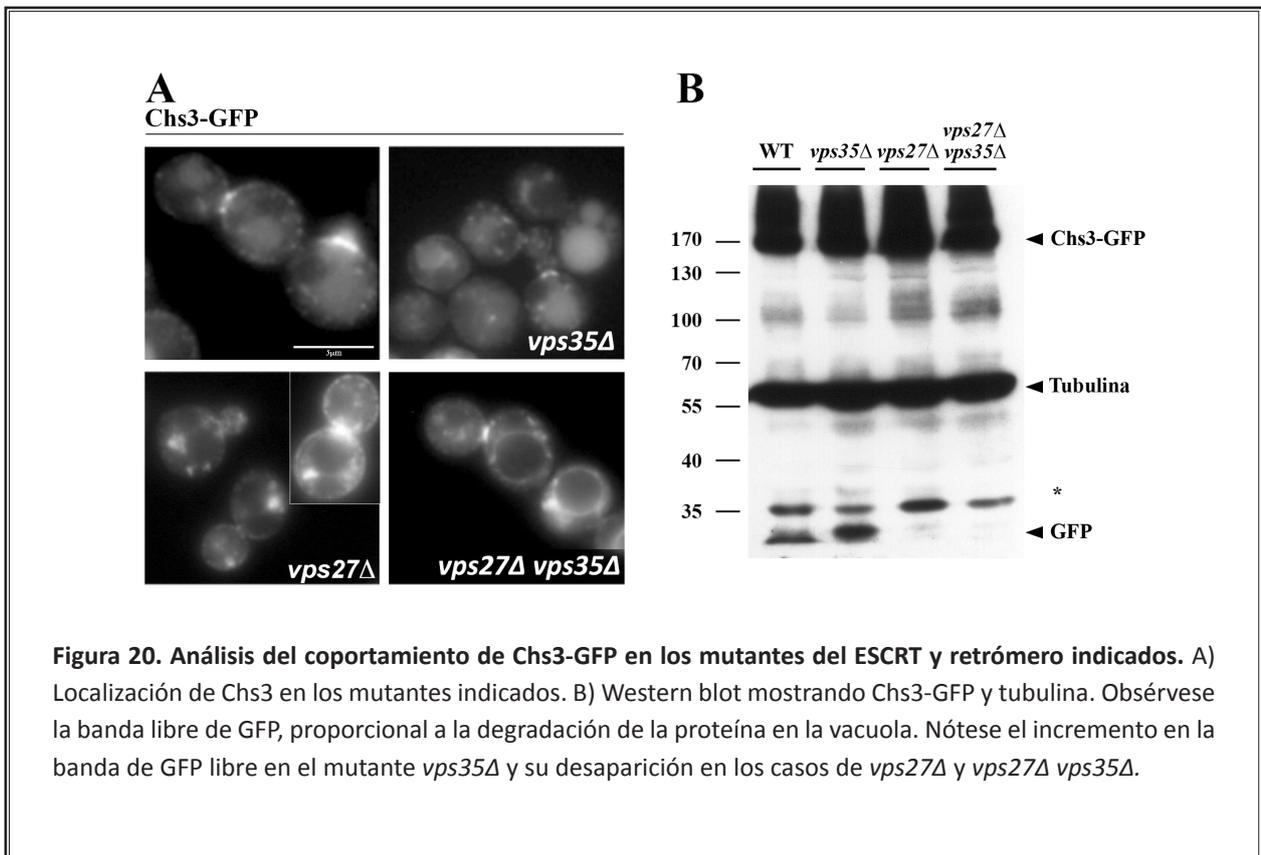
Mucho más concluyente fue la localización de Chs3-GFP en el mutante doble *vps27Δ vps35Δ* (**Figura 16A**). En esta cepa, Chs3-GFP se encontraba en el cuello y TGN, pero también en el compartimento de clase E y, notablemente, en la membrana de la vacuola en más del 80% de las células (**Figura 16B**), apuntando este resultado a un papel del retrómero en el reciclado de Chs3 desde los endosomas tardíos cuando la proteína no era internalizada en las ILVs. Sin embargo, en todos estos mutantes Chs3 mostraba una distribución normal en el cuello y el reservorio del TGN, de acuerdo con los niveles normales de quitina determinados mediante tinción con calcoflúor (resultados no mostrados). Esto sugiere que sólo una fracción de Chs3 viaja de manera regular por el compartimento endosomal tardío, mientras que el resto de la proteína sigue la ruta de reciclado temprano previamente descrita. Destacar también, que la localización de Snc1, otra proteína integral de membrana sujeta a reciclado endocítico a través de endosomas tempranos y el complejo AP-1 (Chen et al., 2011), no estaba alterada en ninguno de estos mutantes (**Figura 19**).



1.2. Niveles de degradación de Chs3 en ausencia de ESCRT y retrómero funcionales.

Para confirmar todas estas observaciones microscópicas, analizamos los niveles de Chs3 en estas cepas por Western blot. Los niveles totales de Chs3 no son una medida precisa de su tráfico por la ruta endosomal tardía debido a su retención mayoritaria a nivel del TGN. Por ello, analizamos la aparición de la forma libre de GFP que se genera tras el procesamiento de Chs3-GFP en la vacuola, y que por tanto es proporcional a los niveles de degradación de la proteína (**Figura 20**). Esta banda de GFP libre era observable en la cepa silvestre, pero sus niveles se incrementaban de manera significativa en el mutante *vps35Δ*, reflejando la mayor degradación de Chs3-GFP en esta cepa. En contraste, la banda de la GFP libre no se observaba ni en el mutante *vps27Δ* ni en el doble *vps27Δ vps35Δ* (**Figura 20**), probablemente debido al fracaso en la formación de las ILVs que evitaría la degradación de la proteína (Raymond et al., 1992; Russell et al., 2012).

En conjunto, estos resultados apoyan el tráfico de Chs3-GFP a través de la ruta endosomal tardía y su degradación en la vacuola; pero también señalan la existencia de un mecanismo de reciclado desde el compartimento endosomal tardío mediado por el retrómero. Así demostramos que Chs3 no sólo es reciclado a nivel de endosomas tempranos a través de la actuación del complejo AP-1, sino que presenta un segundo sistema de reciclado, esta vez a nivel de endosomas tardíos y mediado por el retrómero. La cantidad precisa de Chs3 que circula por la ruta endosomal tardía es extremadamente difícil de evaluar debido a la complejidad del tráfico de Chs3. De forma indirecta, la relación entre las intensidades de las bandas de Chs3-GFP y de GFP libre que muestra el Western blot (**Figura 20**), junto con la moderada resistencia a calcoflúor del mutante *vps35Δ*, señalan que aunque es un tráfico minoritario, no es funcionalmente despreciable.

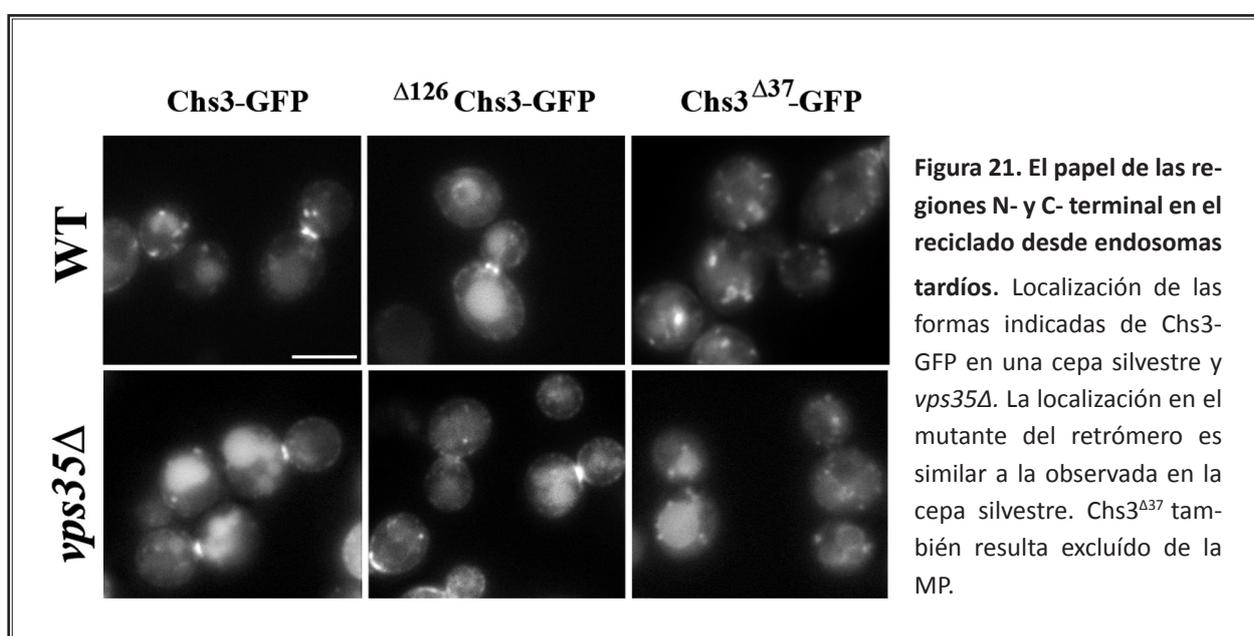


2. Chs3 ES RECICLADO DESDE LOS ENDOSOMAS TARDÍOS POR EL RETRÓMERO DEPENDIENDO DE SU EXTREMO N-TERMINAL.

El reciclado por el retrómero, al igual que el mediado por AP-1, requiere un reconocimiento efectivo de Chs3 como cargo. En levaduras se ha descrito la existencia de adaptadores específicos para el reconocimiento de algunos cargos del retrómero, como el transportador de hierro Ftr1-Fet3 (Strochlic et al., 2008), sin embargo, las señales que median el reconocimiento del cargo todavía no han sido elucidadas. Estudios previos han demostrado que Chs3 interacciona con otros complejos que dirigen su tráfico a través de sus dominios citosólicos N- y C-terminales. Una región discreta del dominio N-terminal de la proteína está implicada en su interacción en endosomas tempranos con el complejo AP-1 (Starr et al., 2012). Además, también se ha propuesto que esta región mediaría en el reconocimiento por el exómero (Starr et al., 2012; Weiskoff and Fromme, 2014). Por otro lado, se ha descrito que el dominio C-terminal es completamente necesario para la interacción con este complejo (Rockenbauch et al., 2012).

2.1. Localización de las truncaciones N-terminal y C-terminal de Chs3 en los mutantes de ESCRT y retrómero.

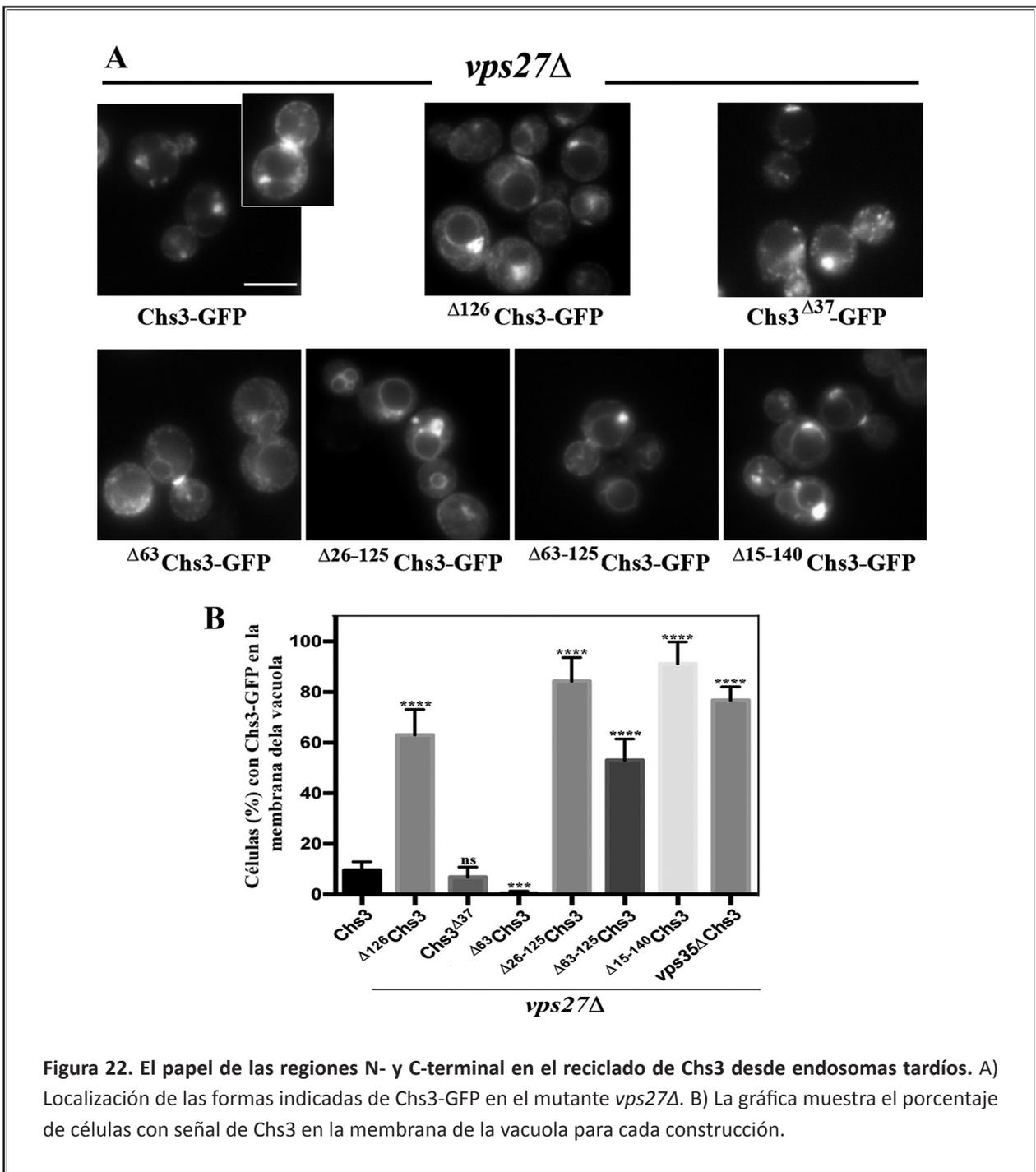
Basándonos en estas evidencias decidimos analizar la localización de las formas truncadas N-terminal (Δ^{126} Chs3) y C-terminal (Chs3 Δ^{37}) de Chs3-GFP en los mutantes *vps27* Δ y *vps35* Δ . Ninguna de estas proteínas truncadas mostró una localización diferencial en el mutante *vps35* Δ en comparación con la cepa silvestre (Figura 21). Sin embargo, la localización en el mutante *vps27* Δ del complejo ESCRT-0 si estaba afectada (Figura 22). Las proteínas Chs3, Δ^{126} Chs3 y Chs3 Δ^{37} quedaban retenidas en el compartimento de clase E en la cepa *vps27* Δ , pero sólo la forma truncada Δ^{126} Chs3 se localizaba también la membrana de la vacuola, como ocurría con la proteína silvestre en el mutante doble *vps27* Δ *vps35* Δ (Figura 20). Esto nos permitió proponer que el extremo citosólico N-terminal de Chs3, pero no el C-terminal, es necesario para el reconocimiento por el retrómero, ya que Δ^{126} Chs3 en ausencia de internalización en ILVs (*vps27* Δ) queda retenida en la membrana de la vacuola al no poder ser reciclada por el retrómero.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

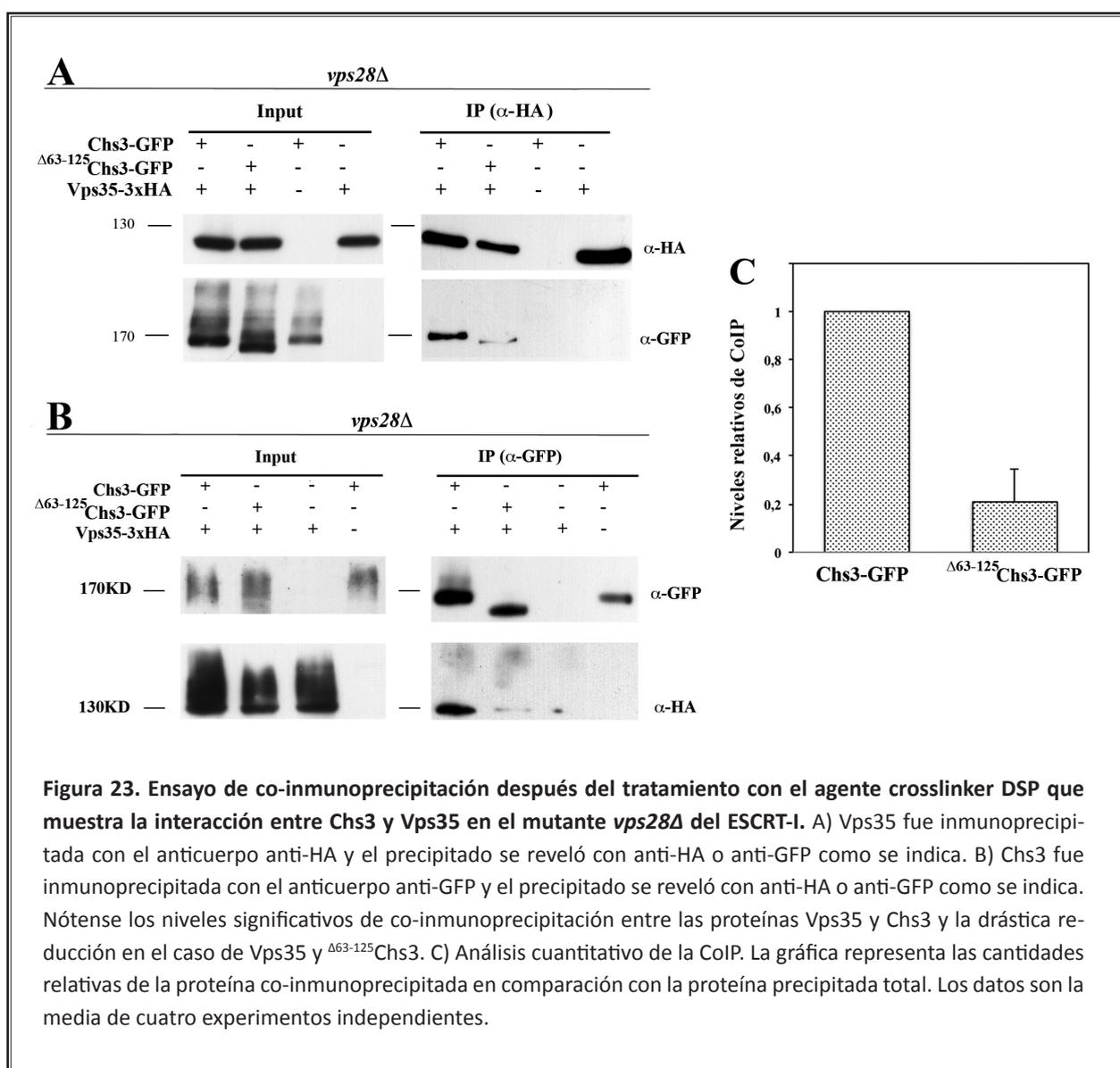
2.2. Determinación de la región N-terminal de Chs3 implicada en el reconocimiento por el retrómero.

El siguiente paso fue analizar el papel de diferentes regiones dentro del extremo N-terminal. La proteína a la que sólo faltan los 63 primeros aminoácidos (Δ^{63} Chs3) no se acumulaba en la membrana de la vacuola, pero la delección de la región entre los aminoácidos 63 y 125 (Δ^{63-125} Chs3), así como otras más amplias, provocaba la retención de estas proteínas truncadas en la membrana de la vacuola en más del 85% de las células del mutante *vps27* Δ (Figura 22), recapitulando los efectos que generaba la delección de *VPS35* y afirmando así la importancia de esta región concreta en el reciclado mediado por el retrómero.



2.3. Chs3 interactúa físicamente con el retrómero por su extremo N-terminal.

Para confirmar estos resultados bioquímicamente, analizamos la interacción física entre Vps35 y Chs3 en el compartimento endosomal tardío mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. En una cepa silvestre no se detectó co-inmunoprecipitación entre ambas proteínas, incluso tras el tratamiento con el agente crosslinker DSP (resultados no mostrados). Sin embargo, la co-inmunoprecipitación sí se detectó al bloquear el tránsito a través de la ruta endosomal tardía mediante el empleo de un mutante del ESCRT-I, *vps28Δ*, (**Figura 23**) (Shi et al., 2011). Sobre esta cepa mutante se marcó la proteína Vps35 con el epítipo 3xHA y se introdujo Chs3 o la forma truncada Δ^{63-125} Chs3 en un plásmido monocopia, ambas fusionadas a GFP. Extractos celulares procedentes de estas cepas se incubaron con el anticuerpo anti-HA acoplado a partículas magnéticas. Tras realizar la inmunoprecipitación (ver “Materiales y Métodos”) se realizaron ensayos de Western blot empleando los anticuerpos anti-GFP y anti-HA para detectar la presencia de Chs3 y Vps35 en los inmunoprecipitados y en los extractos celulares. Como se observa en la **Figura 23A**, Chs3-GFP se detectó en el inmunoprecipitado procedente de la cepa que portaba ambas proteínas marcadas, pero



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

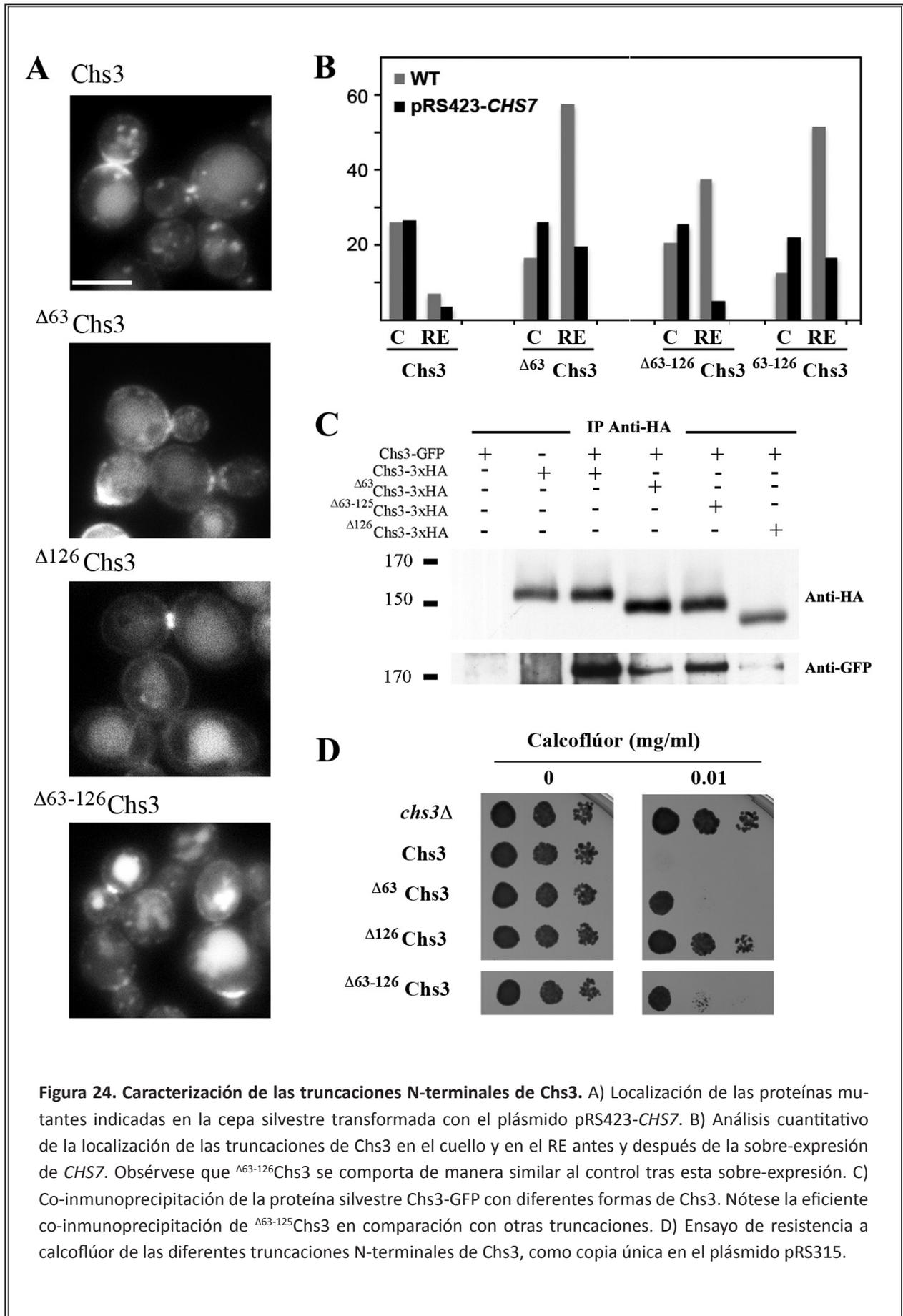
no en los precedentes de las cepas empleadas como controles, indicando la existencia de una interacción entre ambas proteínas en el endosoma tardío. Δ^{63-125} Chs3-GFP también se detectó en el inmunoprecipitado de la cepa correspondiente, pero sus niveles se reducían hasta cuatro veces en comparación con los de la proteína silvestre, reflejando una menor interacción entre Vps35 y Δ^{63-125} Chs3 y explicando así la acumulación de esta última en la membrana de la vacuola en el mutante *vps27Δ*.

La necesidad de concentrar ambas proteínas en el compartimento de clase E, al bloquear la ruta del MVB en el mutante *vps28Δ*, así como la necesidad de usar el agente crosslinker DSP, reflejan la naturaleza transitoria de esta interacción. Además, y como ya mencionamos, hay que tener en consideración que el porcentaje de Chs3 que sigue esta ruta y es reciclado por retrómero es una parte minoritaria de la proteína. Para descartar un falso positivo tras el empleo del agente crosslinker, debido a la inmunoprecipitación de proteínas situadas en el mismo compartimento, se llevó a cabo la inmunoprecipitación inversa (**Figura 23B**) obteniendo de nuevo una interacción específica y diferencias significativas entre la interacción de Vps35 con Chs3 o Δ^{63-125} Chs3. Estos resultados nos permiten demostrar que Chs3 y el retrómero interactúan y que la región N-terminal de Chs3 comprendida entre los aminoácidos 63 y 125 tiene un papel fundamental en la misma; aunque no podemos discernir si ésta interacción es directa con Vps35 o está mediada por otra subunidad.

2.4. Análisis de la funcionalidad de las truncaciones N-terminales de Chs3.

Las proteínas truncadas en el extremo N-terminal de Chs3, si bien son funcionales, presentan una disminución en el número de vesículas intracelulares y una cierta deslocalización por la MP lateral que es independiente de Chs4 (Sacristan et al., 2013) (**Figura 24A**). Este fenotipo es característico de un retraso en la endocitosis, que puede explicarse por una oligomerización ineficiente de estas proteínas (**Figura 24C**). Este defecto en la oligomerización se refleja por la menor co-inmunoprecipitación de Δ^{63} Chs3-3xHA y de Δ^{126} Chs3-3xHA con la proteína silvestre Chs3-GFP, en comparación con los niveles de co-inmunoprecipitación de la forma silvestre Chs3-3xHA. Sin embargo, la forma truncada Δ^{63-125} Chs3 oligomeriza correctamente (**Figura 24C**) y además, es capaz de salir eficientemente del RE tras la sobre-expresión de *CHS7* (**Figura 24B**).

Aunque las cepas que expresan las proteínas truncadas presentan niveles de quitina normales, exhiben una mayor resistencia a calcoflúor que la cepa que expresa la proteína silvestre (**Figura 24D**). La deslocalización de Chs3 en la MP lateral puede explicar esta resistencia en las cepas que portan las proteínas Δ^{63} Chs3 o Δ^{126} Chs3. Sin embargo, la proteína Δ^{63-125} Chs3 no presenta estos defectos y es resistente a calcoflúor de manera similar a la cepa *vps35Δ* (**Figura 18**), lo que estaría en concordancia con su limitado reciclado por el retrómero.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Nuestros resultados, por lo tanto, identifican la proteína Chs3 como nuevo cargo del retrómero. Es significativo que los dos complejos implicados en el reciclado de esta proteína, AP-1 y retrómero, dependan de la región citosólica N-terminal de la misma, aunque los dominios reconocidos por estos dos complejos parecen diferentes. Mientras que las secuencias implicadas en el reconocimiento por AP-1 se sitúan en el inicio de esta región (Starr et al., 2012), la que media la interacción con el retrómero está más alejada (**Figura 25**), probablemente después del dominio de oligomerización, también situado a este nivel (Sacristán et al., 2013). Así, la región citosólica N-terminal de Chs3, que supone sólo el 15% de la proteína, actúa como una auténtica plataforma para el reconocimiento por los adaptadores, siendo esencial en la regulación del reciclado de Chs3.

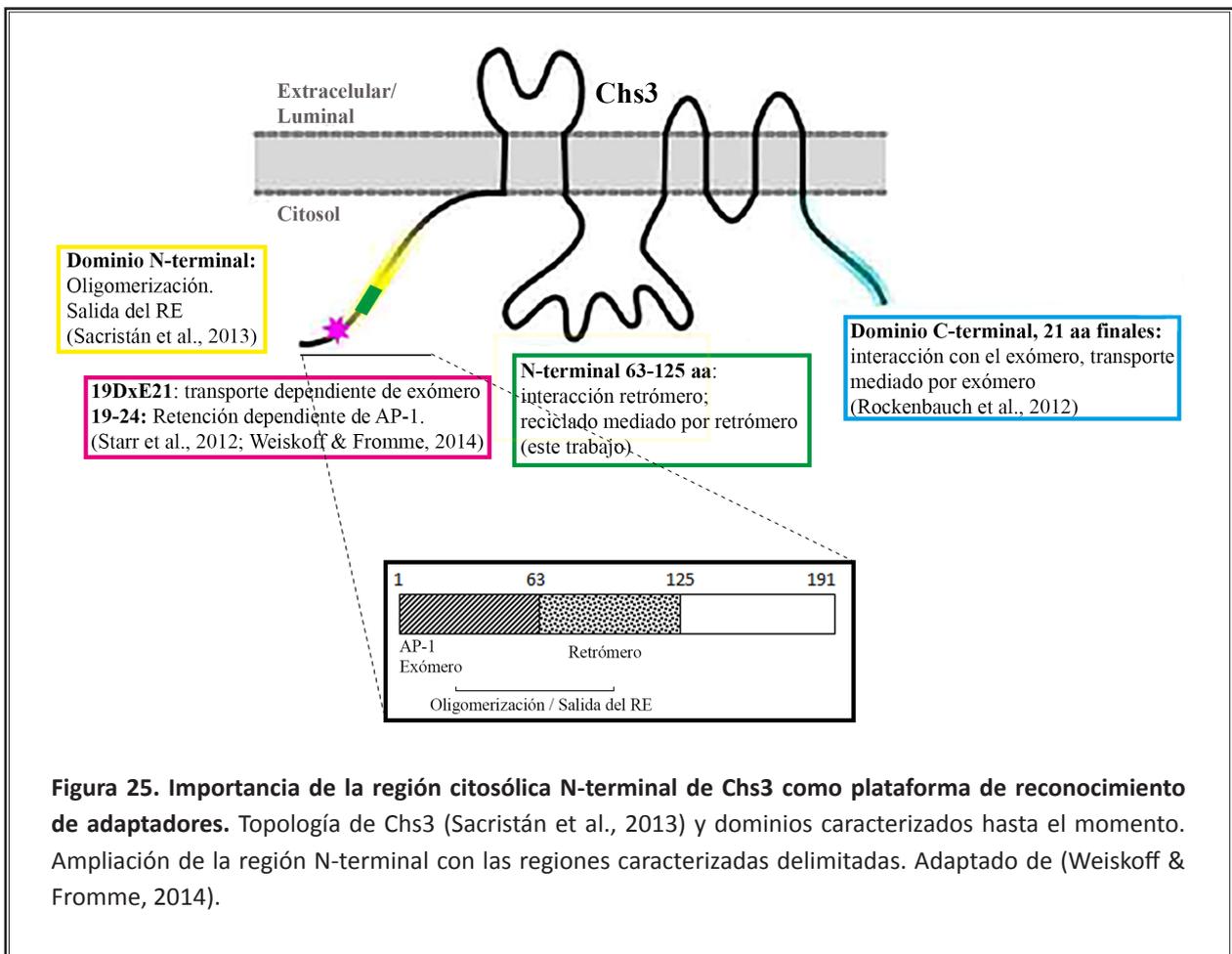


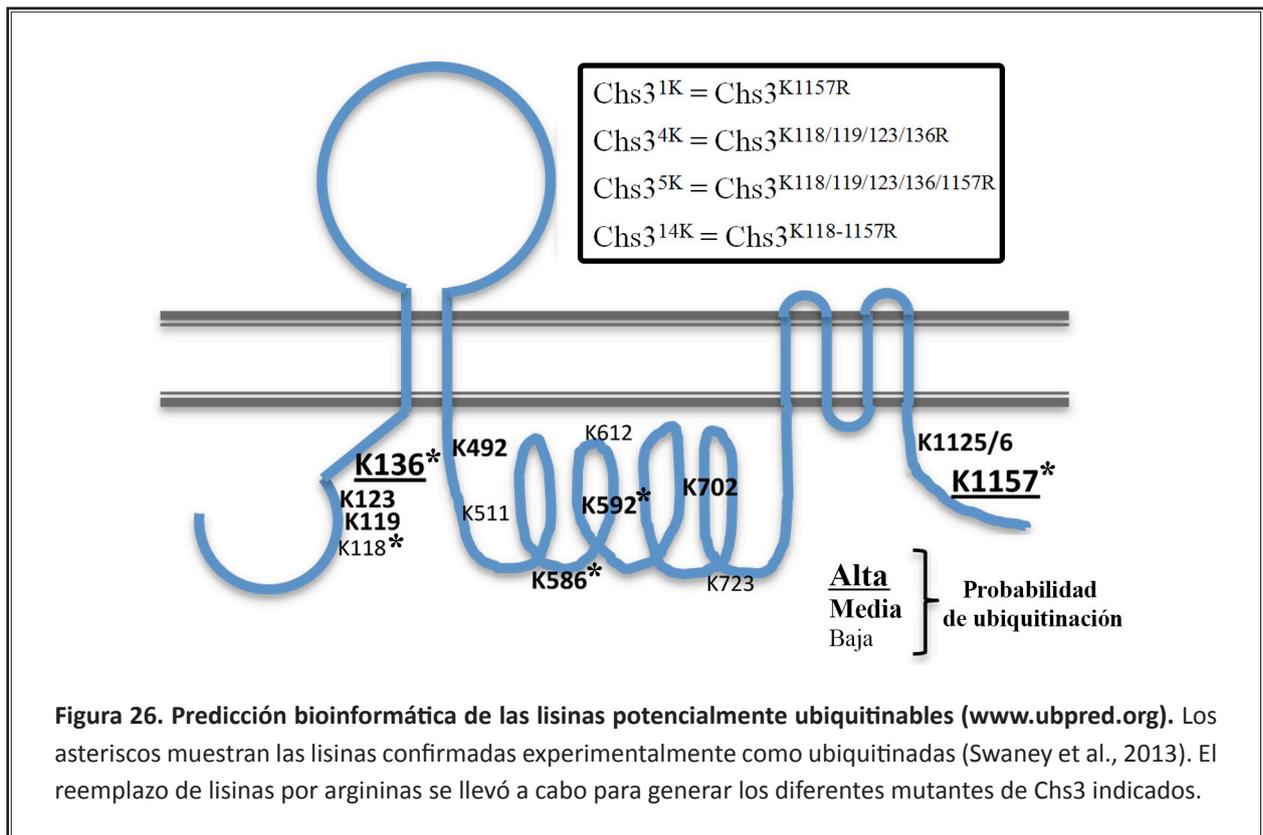
Figura 25. Importancia de la región citosólica N-terminal de Chs3 como plataforma de reconocimiento de adaptadores. Topología de Chs3 (Sacristán et al., 2013) y dominios caracterizados hasta el momento. Ampliación de la región N-terminal con las regiones caracterizadas delimitadas. Adaptado de (Weiskoff & Fromme, 2014).

3. EL TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE Chs3 ESTÁ REGULADO POR UBIQUITINACIÓN.

El tránsito de proteínas por la ruta endosomal tardía está asociado a su degradación vacuolar. Este proceso es mediado por complejo ESCRT, implicado en el reconocimiento de proteínas ubiquitinadas y su posterior internalización en las ILVs, paso previo a la degradación de estas proteínas en la vacuola (Raiborg and Stenmark, 2009). Por lo tanto, cabría esperar que el tráfico de Chs3 a través de los endosomas tardíos dependiera de su ubiquitinación.

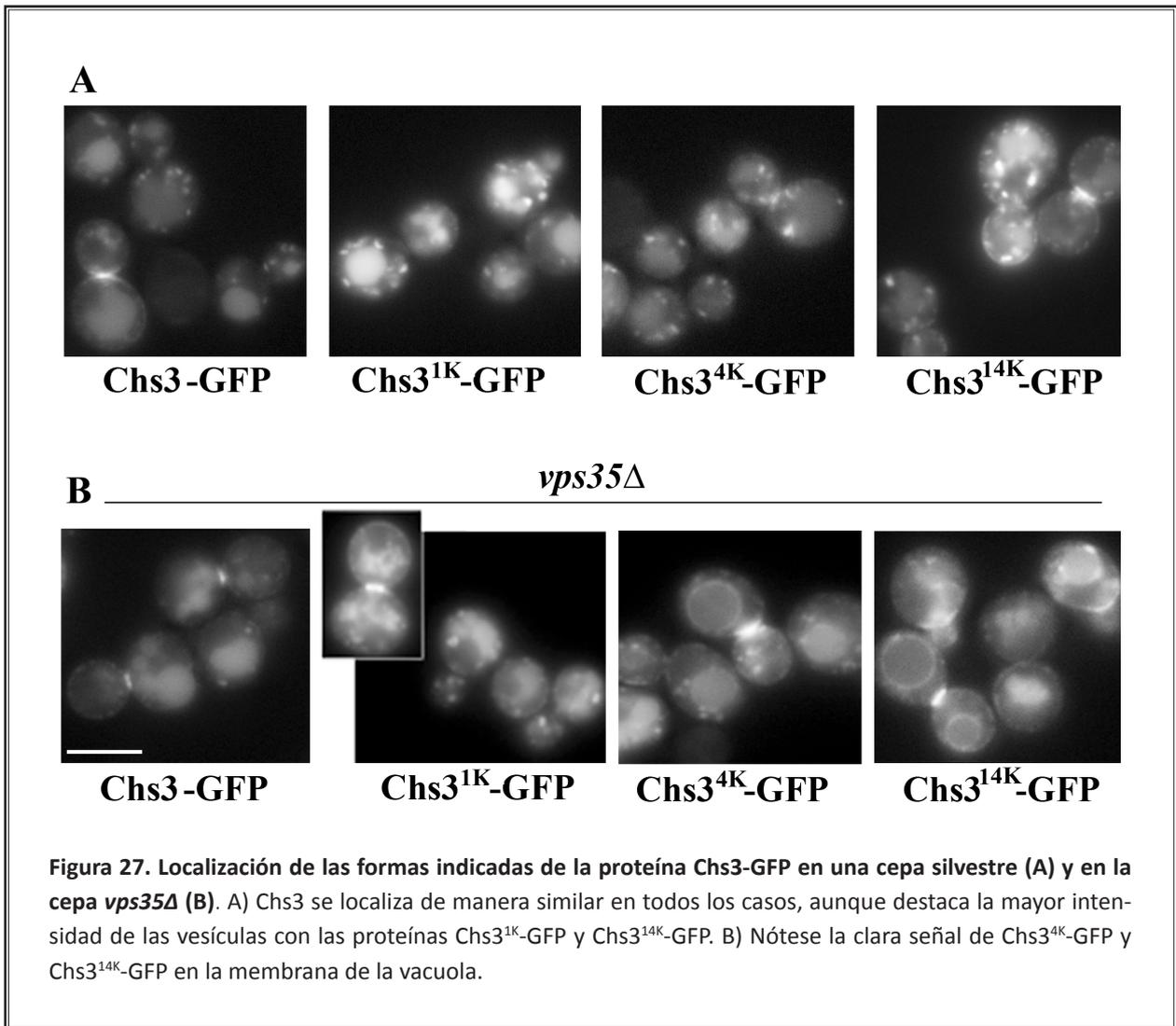
3.1. Determinación de las lisinas potencialmente ubiquitinables de Chs3 y generación de las proteínas deficientes en ubiquitinación.

Basándonos en un análisis bioinformático (www.ubpred.org), comprobamos que Chs3 contiene 14 lisinas potencialmente ubiquitinables (**Figura 26**), varias de las cuales fueron confirmadas experimentalmente durante el desarrollo de este trabajo (Swaney et al., 2013). Por otra parte, ya hemos mencionado la importancia de las regiones N- y C-terminales en el tráfico de Chs3 (Weiskoff and Fromme, 2014). Estas dos premisas nos llevaron a iniciar nuestro trabajo centrándonos en estas regiones y reemplazando por arginina cuatro lisinas próximas emplazadas en el extremo N-terminal, K 118, 119, 123 y 136, para generar la proteína mutada Chs3^{4K}-GFP (**Figura 26**). Además, reemplazamos de forma independiente la lisina del extremo C-terminal K1157, generando la proteína Chs3^{1K}-GFP. Finalmente se reemplazaron los 14 residuos de lisina potencialmente ubiquitinables en la construcción Chs3^{14K}-GFP (ver Materiales y Métodos para una explicación más detallada de la construcción de estas proteínas).

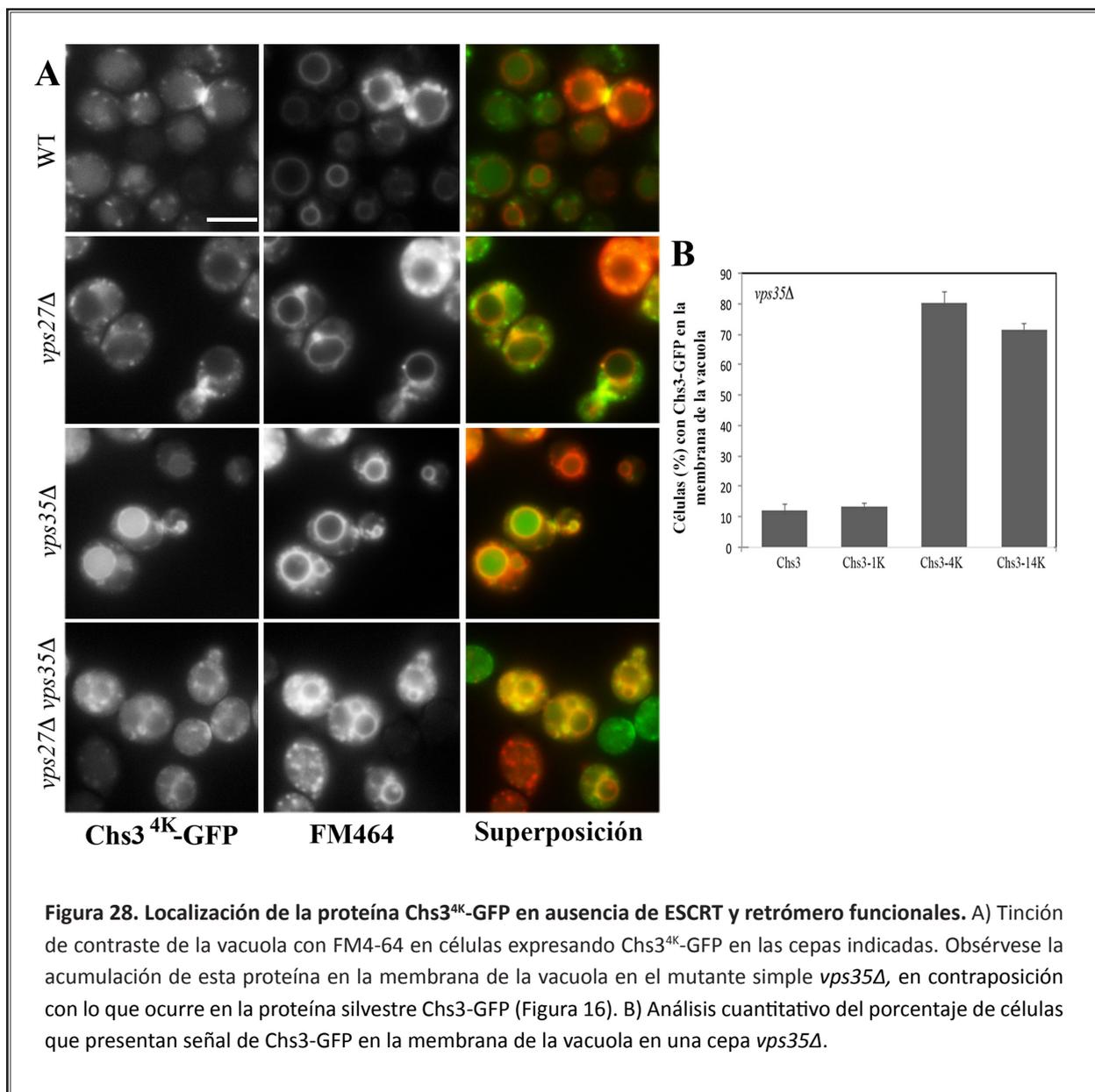


3.2. Caracterización de las proteínas Chs3 deficientes en ubiquitinación

Inicialmente estudiamos el tráfico de estas proteínas por microscopía de fluorescencia en diferentes cepas. En la cepa silvestre, todas las proteínas se localizaban en el cuello y vesículas intracelulares (TGN/endosomas tempranos) de manera similar a la proteína silvestre; aunque las proteínas Chs3^{1K}-GFP y Chs3^{14K}-GFP destacaban por un marcado aumento de la intensidad de fluorescencia en los compartimentos TGN/endosomas tempranos (**Figura 27**) (este fenotipo es analizado con mayor detalle en los apartados 7 y 8 de Resultados).

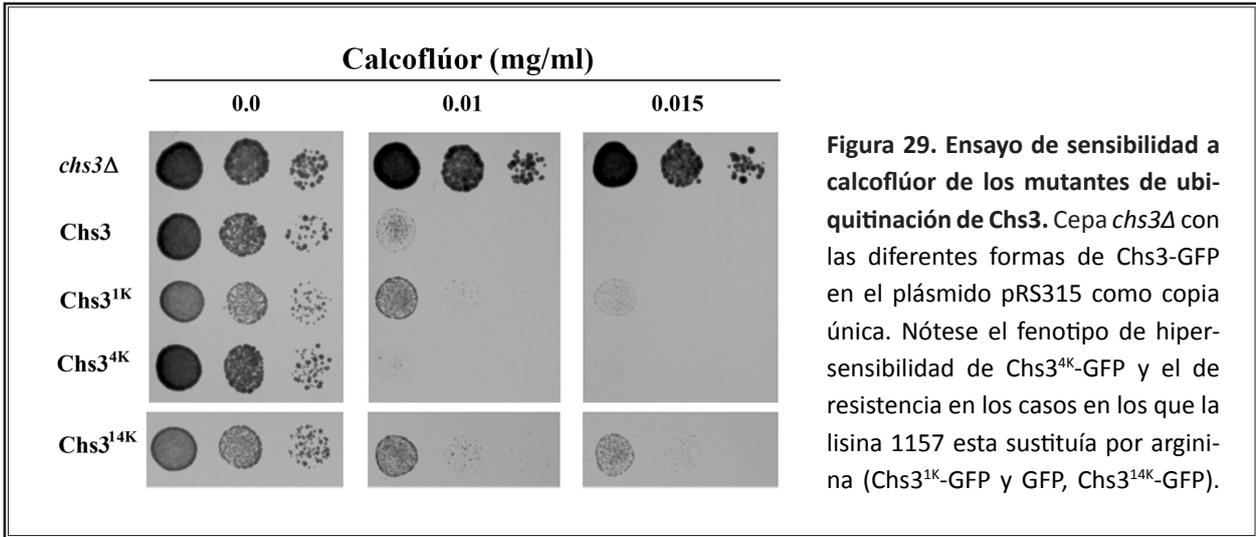


No se encontró ninguna diferencia en la localización intracelular de estas proteínas en el mutante *vps27*Δ (**Figura 28** y resultados no mostrados). Sin embargo, la inhibición de la función del retrómero por la delección de *VPS35*, provocaba la deslocalización de las proteínas Chs3^{4K}-GFP y Chs3^{14K}-GFP hacia la membrana de la vacuola en la mayor parte de las células (>70%) (**Figura 27B y 28**), de manera semejante a lo que sucedía con la proteína silvestre en la cepa *vps27*Δ *vps35*Δ. Así parecería que estas proteínas mutadas no son reconocidas por el complejo ESCRT y como resultado no pueden ser incorporadas en las ILVs, quedando en la membrana de la vacuola cuando el retrómero no está presente.



Además, el análisis de los fenotipos de sensibilidad a calcoflúor, mostró que la proteína Chs3^{4K}-GFP confiere un patrón de ligera hipersensibilidad a este compuesto, mientras que las otras mutaciones, todas portando la lisina K1157 sustituida por arginina, eran moderadamente resistentes a calcoflúor en comparación con la proteína silvestre (**Figura 29**). Este último fenotipo probablemente esté asociado con la mayor intensidad de fluorescencia en el reservorio TGN/endosomas tempranos que se observa para estas proteínas, lo que sugiere a su vez su mayor acumulación en el TGN.

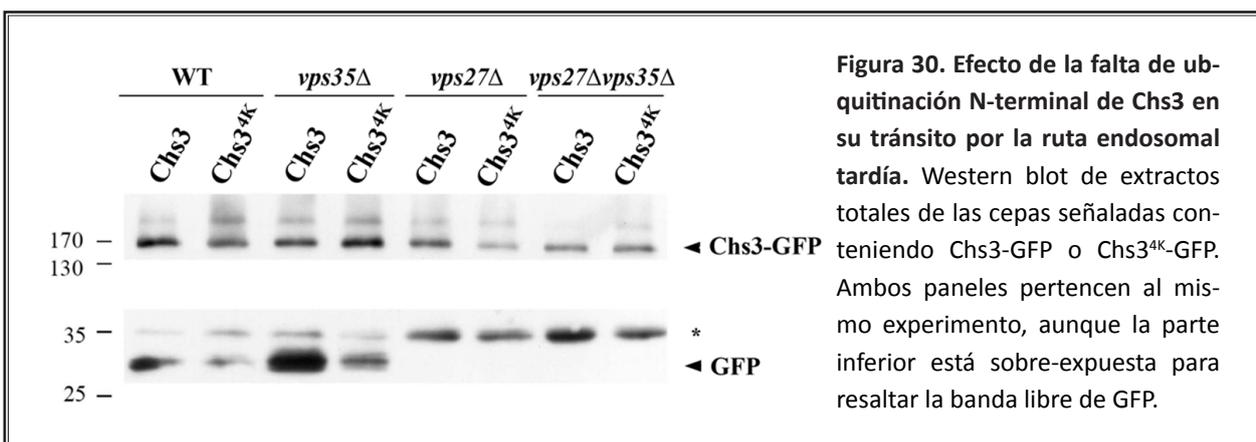
En conjunto, estos resultados muestran la relevancia biológica de la ubiquitinación de Chs3, pero también sugieren diferentes papeles para la ubiquitinación N- y C-terminal de la proteína, en consonancia con las distintas funciones biológicas atribuidas a estas dos regiones. Muestra además, que la proteína a la que faltan las 14 lisinas, Chs3^{14K}-GFP, recapitula los fenotipos asociados con la falta de ubiquitinación en ambos dominios.



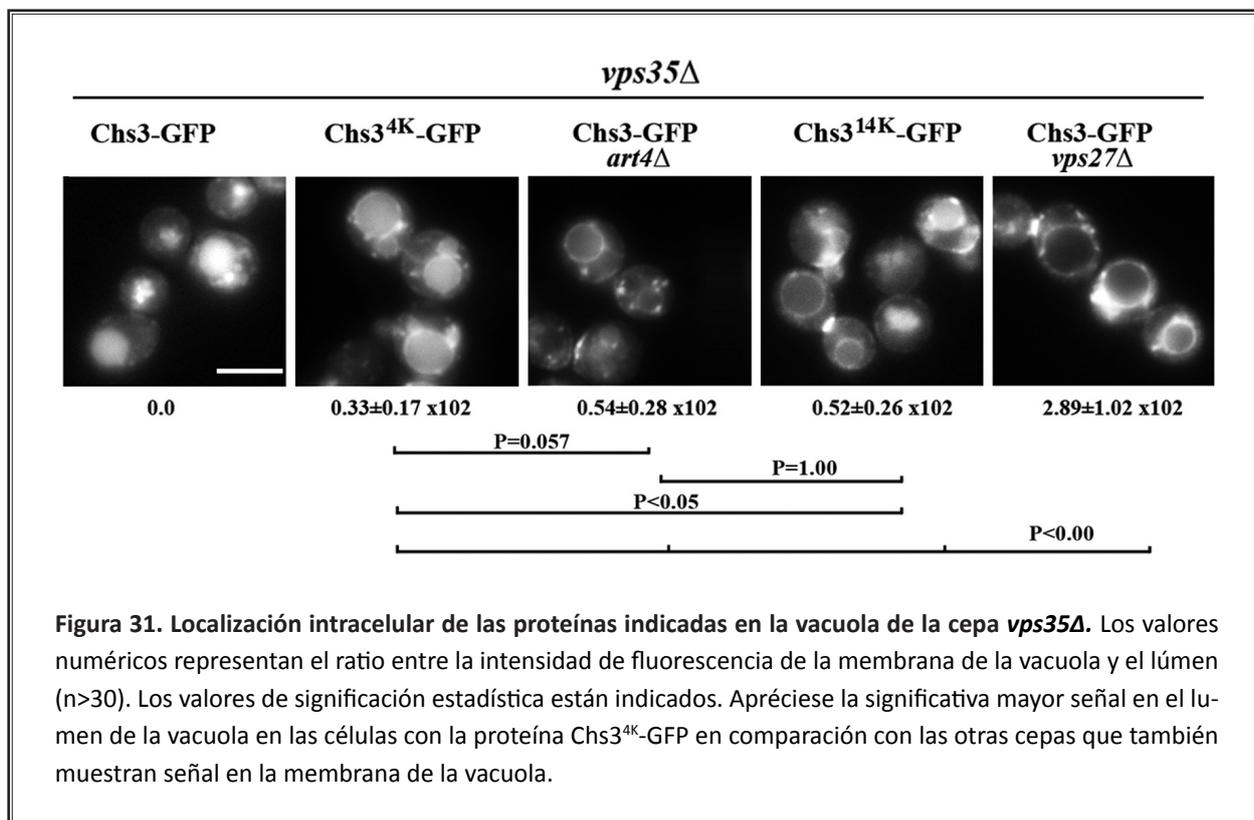
Otra conclusión destacable se infiere de la aparentemente correcta localización de Chs3^{14K}-GFP en cuello y endosomas, tanto en la cepa silvestre como en el resto de mutantes analizados (**Figura 27**). Para la mayor parte de las proteínas de MP la ubiquitinación es necesaria para el reconocimiento por la maquinaria endocítica (MacGurn et al., 2012), sin embargo Chs3^{14K}-GFP no se queda acumulada en la MP ni presenta ningún otro defecto aparente en su endocitosis, llevándonos a la conclusión de que la endocitosis de Chs3 ocurre de manera independiente de la ubiquitinación. Aun así, no podemos descartar todavía la posibilidad de que existan señales de ubiquitinación no descritas que pudieran mediar la endocitosis de Chs3.

3.3. La ubiquitinación N-terminal de Chs3 regula su tránsito por la ruta endosomal tardía.

Los resultados arriba presentados relacionan directamente la ubiquitinación N-terminal de Chs3 con su tránsito por el compartimento endosomal tardío, y por tanto, con su reconocimiento por la maquinaria del ESCRT, sugiriendo que la proteína que carece de esta señal evita su degradación en este compartimento. Esta hipótesis se confirmó bioquímicamente al determinar por Western blot que la proteína Chs3^{4K}-GFP genera unos niveles de GFP libre reducidos en comparación con la proteína Chs3-GFP, tanto en la cepa silvestre como más claramente en el mutante *vps35Δ* (**Figura 30**).



Sin embargo, la degradación no era completamente suprimida como en el caso de la cepa *vps27Δ* (**Figura 30**), en consonancia con la señal parcial de Chs3^{4K}-GFP que se puede observar en el lumen de la vacuola del mutante *vps35Δ* (**Figura 31**). Este resultado sugiere la existencia de señales adicionales que regulan el tráfico de Chs3 hacia la vacuola, señales que pueden ser complementarias de la ubiquitinación descrita o bien estar implicadas en el tráfico de Chs3 por nuevas vías.



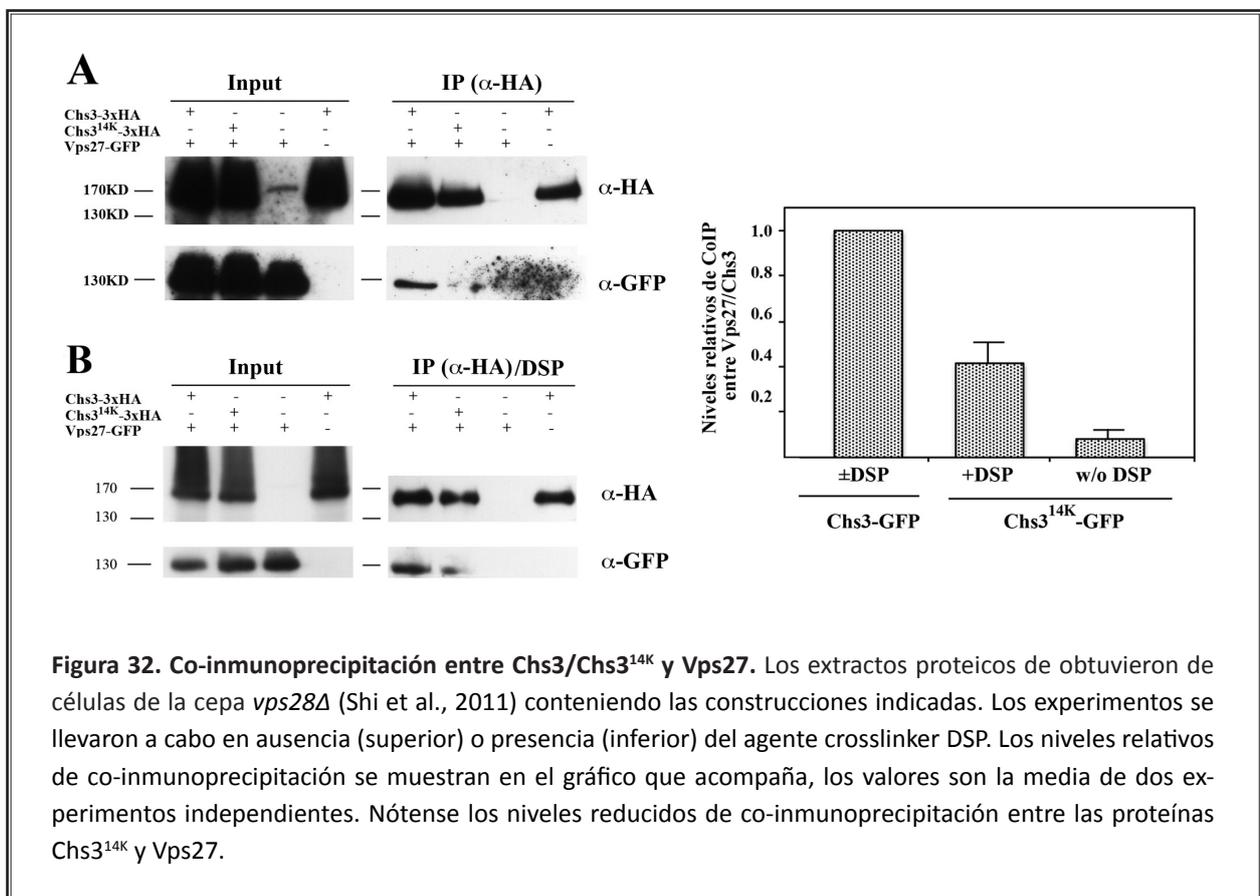
3.4. Chs3 interacciona con el complejo ESCRT de manera dependiente de su ubiquitinación.

Basándonos en las evidencias anteriormente presentadas, abordamos la interacción física entre la proteína Chs3 y el complejo ESCRT mediante experimentos de co-inmunoprecipitación. Sobre la cepa mutante del ESCRT-I *vps28Δ* (empleada de nuevo para concentrar ambas proteínas en el mismo orgánulo) marcamos la proteína Vps27 del ESCRT-0 con el epítipo GFP e introdujimos Chs3-3xHA o la proteína mutante Chs3^{14K}-3xHA en un plásmido monocopia. Se incubaron extractos celulares procedentes de estas cepas con el anticuerpo anti-HA en presencia y ausencia del agente crosslinker DSP. Tras realizar la inmunoprecipitación se realizaron ensayos de Western blot. Como se observa en la **Figura 32**, Vps27-GFP se detectó en el inmunoprecipitado de la cepa con las dos proteínas marcadas, pero no en los procedentes de las cepas empleadas como controles, de manera independiente de empleo de DSP, indicando que Chs3 y Vps27 interaccionan. Sin embargo, los niveles de Vps27-GFP que se detectaron en el inmunoprecipitado de la cepa expresando Chs3^{14K}-3xHA fueron mucho menores que los detectados en el inmunoprecipitado de la proteína silvestre, una clara indicación de la menor interacción de la proteína Chs3^{14K} con Vps27. Estos resultados, por lo tanto, resaltan la importancia de la ubiquitinación de Chs3 en su reconocimiento por el complejo ESCRT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cómo ya mencionábamos en la introducción, los subcomplejos ESCRT-0, -I y -II presentan dominios de unión a ubiquitina, funcionando de forma solapada y conjunta en el reconocimiento de los cargos (Henne et al., 2011). Esto, junto con las diferencias de localización encontradas entre las proteínas Chs3^{4K} y Chs3^{14K}, nos lleva a plantear la posibilidad de que la ubiquitinación N-terminal de Chs3 sea la señal directora de este tráfico, pero que el resto de lisinas potencialmente ubiquitinadas acompañen también en el reconocimiento por estos tres subcomplejos.

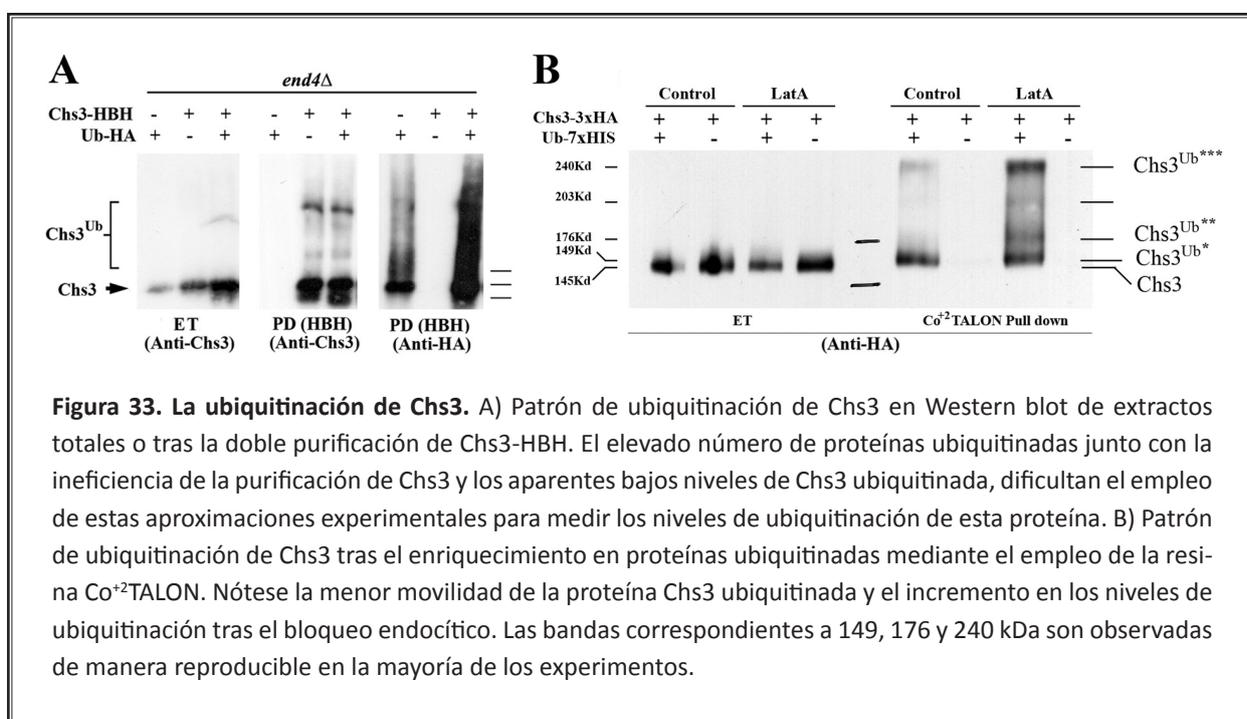
Todos estos resultados nos permiten concluir que el tráfico endosomal tardío de Chs3 depende la ubiquitinación de residuos específicos de lisina situados en el extremo citosólico N-terminal de la proteína. Esta ubiquitinación es la señal reconocida por el complejo ESCRT para dirigir la degradación de Chs3 en la vacuola, aunque puede ser amplificada por la ubiquitinación en otras lisinas de la proteína.



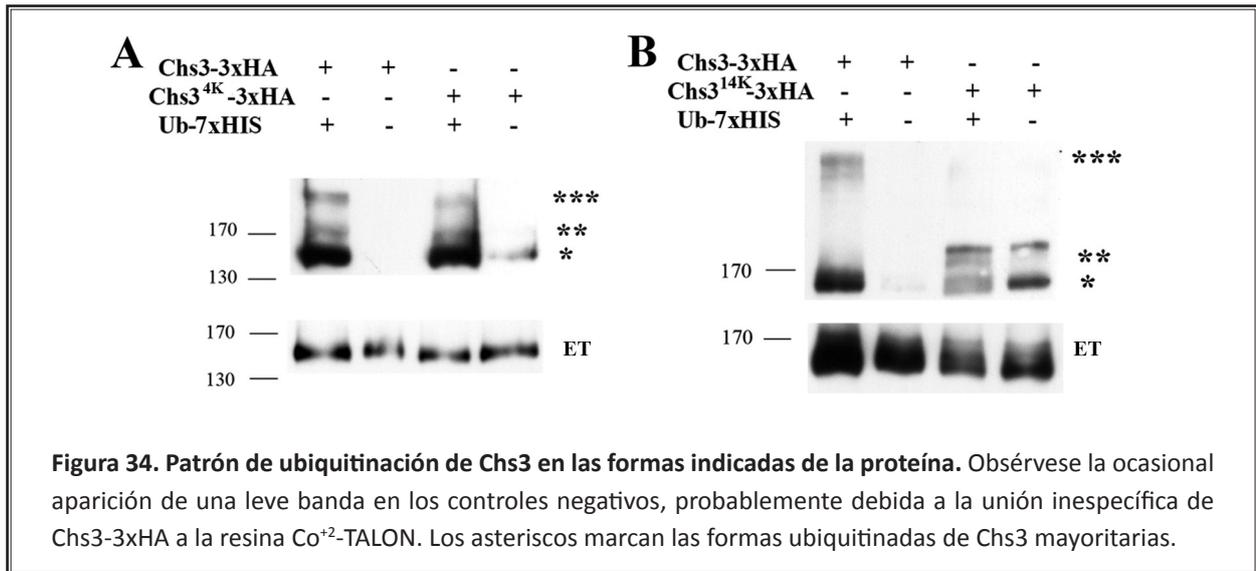
4. Chs3 ES UBIQUITINADA EN LA MP POR LA UBIQUITINA LIGASA Rsp5.

4.1. Análisis de los niveles de ubiquitinación de Chs3.

Hasta ahora nuestros resultados destacan la relevancia funcional de la ubiquitinación de Chs3, pero desconocíamos los niveles generales de dicha ubiquitinación, así como la maquinaria molecular implicada en el proceso. Por ello se decidió abordar directamente el análisis de los niveles de ubiquitinación de Chs3 por diferentes métodos. El Western blot directo de las formas ubiquitinadas de Chs3 no produjo resultados fiables (**Figura 33A**), probablemente por la pequeña fracción de Chs3 que está ubiquitinada. Por ello se decidió recurrir a una técnica basada en la expresión inducible de ubiquitina marcada con el epítipo 7xHis seguida de la purificación de todas las proteínas ubiquitinadas mediante el empleo de la resina selectiva Co²⁺TALON y la posterior detección de Chs3-3xHA por Western blot (Parker et al., 2007).

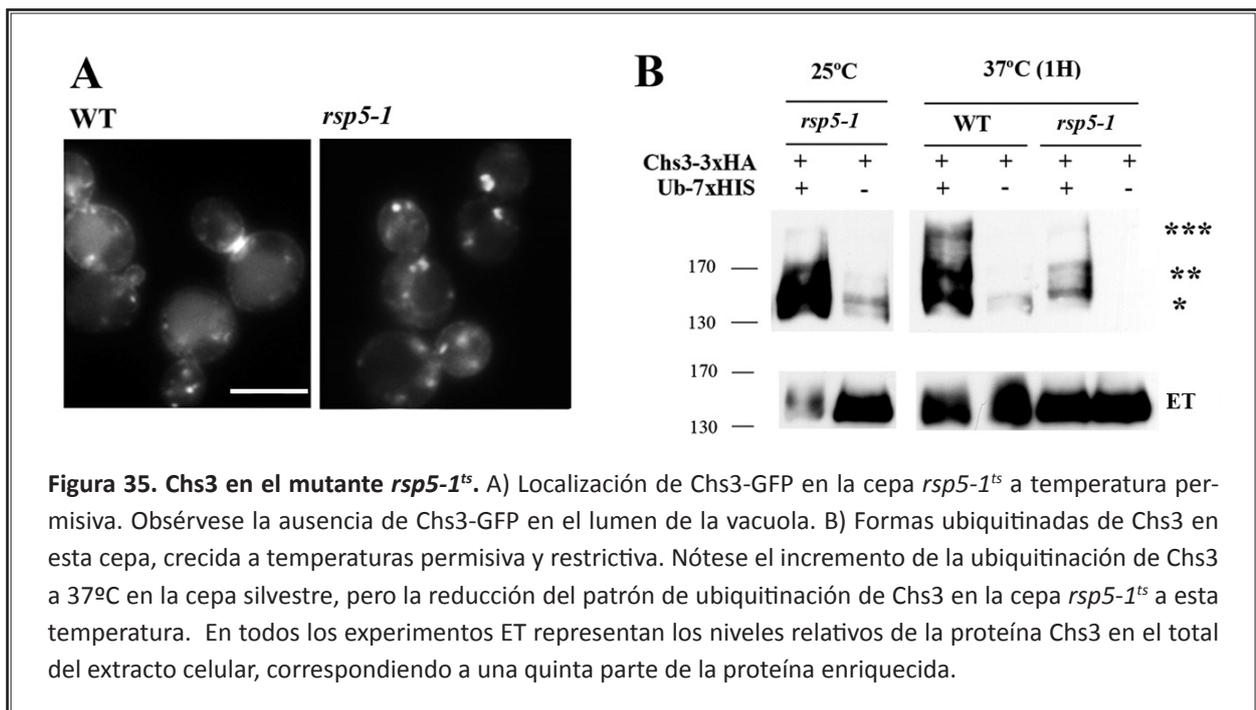


El enriquecimiento de proteínas ubiquitinadas daba lugar, de manera reproducible, a tres bandas de Chs3 de aproximadamente 149, 176 y 240 kDa, que no aparecían en los controles carentes de la ubiquitina marcada (**Figura 33 y 34**). La banda más abundante correspondía a la de 149 kDa, apenas visible en los extractos purificados de las células control (**Figura 34** y siguientes) y con una movilidad electroforética ligeramente inferior a la de la forma no ubiquitinada de Chs3 (**Figura 33B**). La proteína Chs3^{4K} no mostró diferencias discernibles en su patrón de ubiquitinación, pero la proteína con todos los residuos potencialmente ubiquitinables mutados, Chs3^{14K}, claramente mostró un patrón alterado y unos niveles generales de ubiquitinación reducidos (**Figura 34**), confirmando así el estado ubiquitinado de Chs3. Aun así, las bandas de ubiquitinación no desaparecen completamente, por lo que pueden existir lisinas adicionales ubiquitinadas, pero no predichas en el análisis bioinformático.



4.2. Rsp5, la ubiquitina ligasa responsable de la ubiquitinación de Chs3.

Teniendo en cuenta las localizaciones intracelulares establecidas para Chs3, la ubiquitina ligasa Rsp5 era la clara candidata para la ubiquitinación de nuestra proteína. Por consiguiente, decidimos analizar el comportamiento de Chs3 en el mutante termosensible *rsp5-1^{ts}* (Li et al., 2011), ya que esta proteína es esencial. A temperatura permisiva, las células de *rsp5-1^{ts}* eran ya extremadamente sensibles a calcoflúor (no mostrado) y presentaban una localización de Chs3-GFP alterada (**Figura 35A**). Más significativo era aún que tras la incubación a temperatura restrictiva los niveles de ubiquitinación de Chs3 en este mutante disminuían drásticamente, produciendo un patrón difuso de bandas (**Figura 35B**) muy similar al descrito para la proteína Chs3^{14K}-GFP. Estos resultados claramente apuntaban que Rsp5 ubiquitina Chs3 en múltiples residuos, pero no esclarecían donde tenía lugar esta ubiquitinación, ya que se ha descrito que Rsp5 actúa en múltiples compartimentos intracelulares.



4.3. La ubiquitinación N-terminal de Chs3 tiene lugar en la MP.

Chs3 actúa en la membrana plasmática por lo que decidimos estudiar si su ubiquitinación tenía lugar aquí. Para ello analizamos los niveles de ubiquitinación de Chs3 en mutantes que ocasionan una acumulación de la proteína en la MP al bloquear su endocitosis (Reyes et al., 2007; Sacristan et al., 2012). De acuerdo con nuestra predicción, los niveles de ubiquitinación de Chs3 se vieron incrementados de manera significativa en los mutantes *syp1Δ* y *rvs161Δ*, pero también después del bloqueo de la endocitosis provocado con la adición de Latrunculina A (LatA), droga que causa la despolimerización de la actina y que bloquea la endocitosis (**Figura 36**). Cabe destacar, que aunque la intensidad de la banda de 149 kDa no presentaba cambios significativos en comparación con el control, lo que si se apreciaba en todos los casos era que la intensidad de las bandas de 176 y 240 kDa (** y ***) se incrementaba significativamente. El estrés térmico también conduce a un bloqueo transitorio de la endocitosis (Delley and Hall, 1999; Lilie and Brown, 1994) y a una acumulación de Chs3 en la MP (Valdivia and Schekman, 2003); de acuerdo con esto, observamos un aumento en los niveles generales de ubiquitinación de Chs3 tras someter las células a un aumento de la temperatura (1 hora a 37°C), siendo, de nuevo, el incremento de la banda de 176 kDa el más prominente (**Figura 36**). Así pues, todas las condiciones que provocaban la acumulación de Chs3 en la MP presentaban también unos mayores niveles de ubiquitinación.

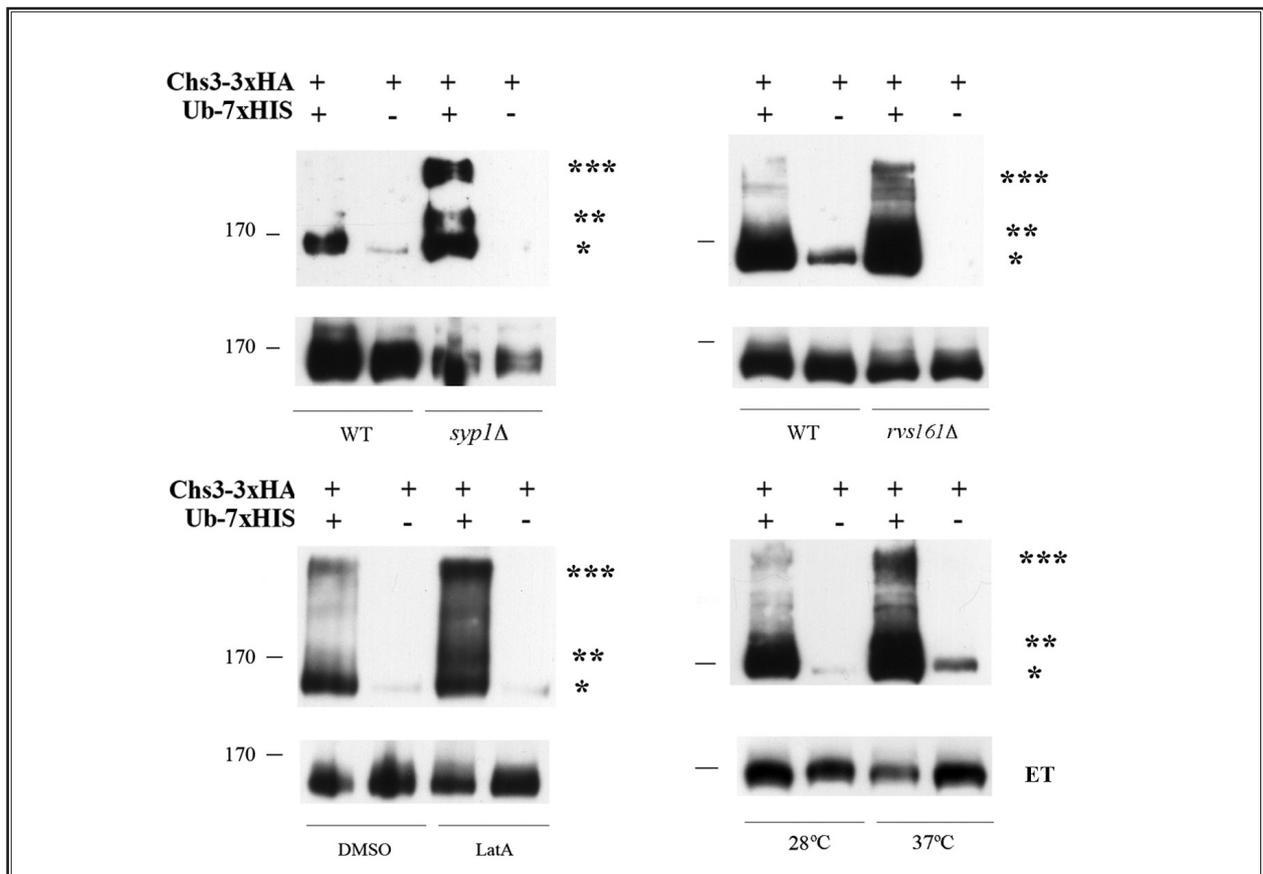


Figura 36. Patrón de ubiquitinación de Chs3 en la membrana plasmática. Ubiquitinación de Chs3 en los mutantes de endocitosis *syp1Δ* y *rvs161Δ*, después del tratamiento con Latrunculina A y tras estrés térmico (1 hora a 37°C) según se indica. Se puede apreciar un incremento general en los niveles de ubiquitinación en todos los casos, pero también el incremento específico de algunas bandas, principalmente ** y ***.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las características generales del tráfico de Chs3 se establecieron hace varios años, existiendo diferentes mutantes que bloquean su tráfico a distintos niveles (ver (Roncero, 2002)). Específicamente, el mutante *chs5Δ* bloquea el tráfico de Chs3 en el TGN, impidiendo su llegada a la MP (Santos and Snyder, 1997). Así, decidimos analizar qué pasaba con la ubiquitinación de la proteína en el caso contrario al anterior, cuando ésta no llegaba a la MP. La determinación de los niveles de ubiquitinación de Chs3 en *chs5Δ*, mostró unos niveles reducidos y la práctica desaparición de las bandas de ubiquitinación de 176 y 240 kDa, permaneciendo inalterada la de 149 kDa (**Figura 37A**).

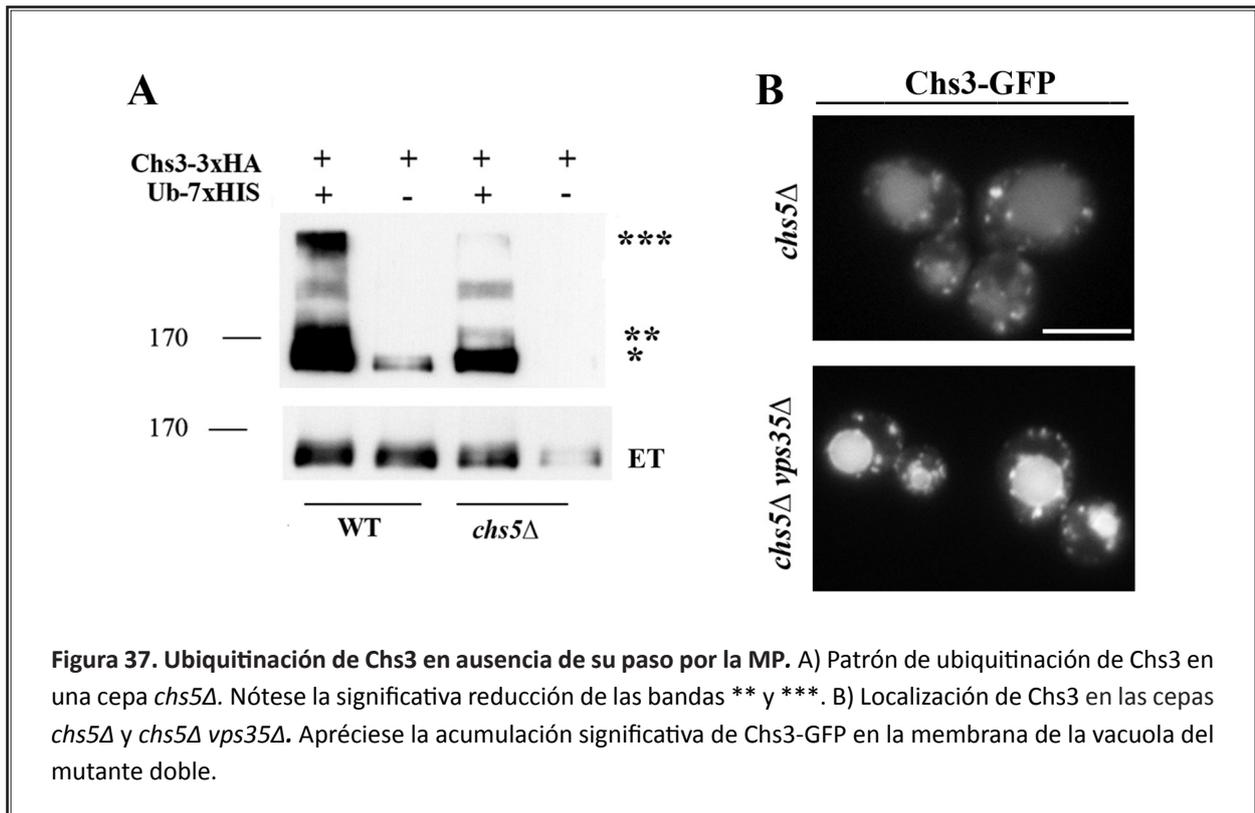
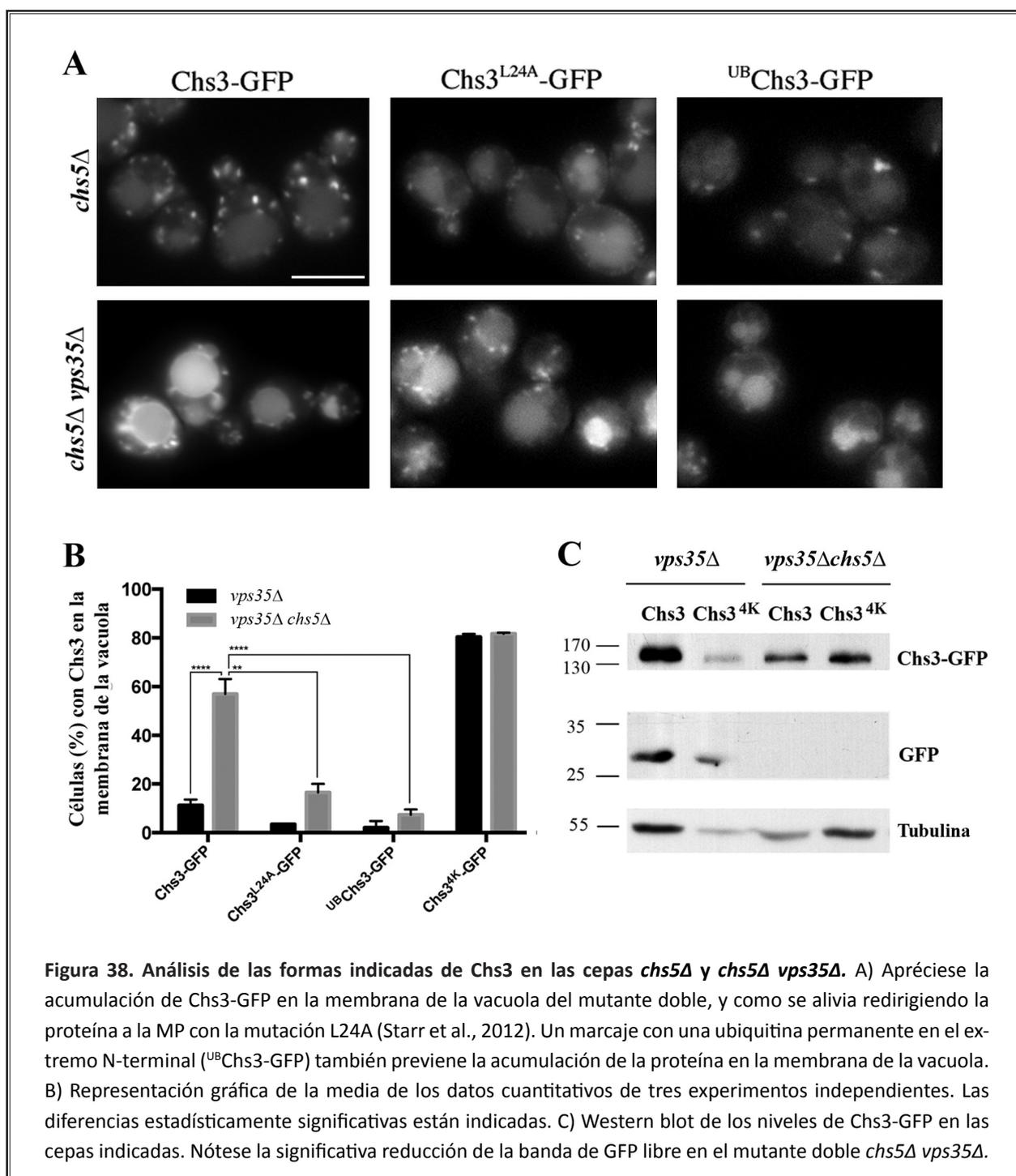


Figura 37. Ubiquitinación de Chs3 en ausencia de su paso por la MP. A) Patrón de ubiquitinación de Chs3 en una cepa *chs5Δ*. Nótese la significativa reducción de las bandas ** y ***. B) Localización de Chs3 en las cepas *chs5Δ* y *chs5Δ vps35Δ*. Apréciase la acumulación significativa de Chs3-GFP en la membrana de la vacuola del mutante doble.

A este resultado se sumó la acumulación de la proteína silvestre Chs3-GFP en la membrana de la vacuola en el mutante doble *vps35Δ chs5Δ* (**Figura 37B y 38A**), de manera similar a lo que sucedía en el mutante simple *vps35Δ* cuando observábamos la proteína carente de ubiquitinación en el extremo N-terminal (**Figura 27B y 28**). Además, experimentos de Western blot mostraron que la liberación de GFP libre de la proteína silvestre Chs3 en el mutante doble *vps35Δ chs5Δ* disminuía significativamente, de manera análoga a lo que sucedía para Chs3^{4K}-GFP en la cepa *vps35Δ* (**Figura 38C**). Estos resultados están en concordancia con los niveles reducidos de ubiquitinación de Chs3 en la cepa *chs5Δ*, apuntando esta falta de ubiquitinación al extremo N-terminal.

Esta localización de Chs3 en la membrana de la vacuola no era consecuencia directa de la mutación *chs5Δ*, sino de la retención de la proteína en el TGN que evita su paso por la MP. Esto es así, ya que la proteína Chs3^{L24A}, capaz de evitar el bloqueo en TGN y llegar a la MP en el mutante *chs5Δ* al perder la interacción con el complejo AP-1 (Starr et al., 2012), no se acumula en la membrana de la vacuola en el mutante doble *vps35Δ chs5Δ* (**Figura 38A, C**).

Estos resultados nos permiten inferir que el paso de la proteína por la MP es necesario para su ubiquitinación, al menos, en el extremo N-terminal, ya que cuando este tránsito por la MP está bloqueado la proteína silvestre presenta los mismos fenotipos que Chs3^{4K}. Si esto fuera así, la restauración de la ubiquitinación N-terminal de Chs3 debería disminuir también su acumulación en la membrana de la vacuola. Para confirmar esta hipótesis, introdujimos una copia de la ubiquitina de manera permanente en el extremo N-terminal de Chs3 (^{UB}Chs3-GFP), y observamos como en este caso la proteína no se acumulaba en la membrana de la vacuola en el mutante doble *vps35Δ chs5Δ* (Figura 38A, B). Así, podemos decir que el bloqueo de Chs3 en el TGN reduce su ubiquitinación y previene su reconocimiento por el complejo ESCRT.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En conjunto, todos estos resultados indican que Chs3 es ubiquitinada por Rsp5 en residuos específicos de lisina en la MP, y que esta ubiquitinación específicamente marca Chs3 para su degradación. Sin embargo, las bandas de ubiquitinación que se mantienen en el mutante *chs5Δ* también sugieren que no toda la ubiquitinación de Chs3 tiene lugar en la MP y que por lo tanto Chs3 debe de estar ubiquitinada en otras lisinas y en diferentes localizaciones intracelulares. Es más, la ubiquitinación remanente en *rsp5-1^{ts}* a temperatura restrictiva, aunque muy minoritaria, nos permite plantear la intervención de otras ubiquitina ligasas en la regulación de Chs3; como sería el caso de la ubiquitina ligasa de la familia RING, Tul1, que localizada en Golgi, participa a este nivel en el control de calidad de proteínas de membrana con dominios transmembrana.

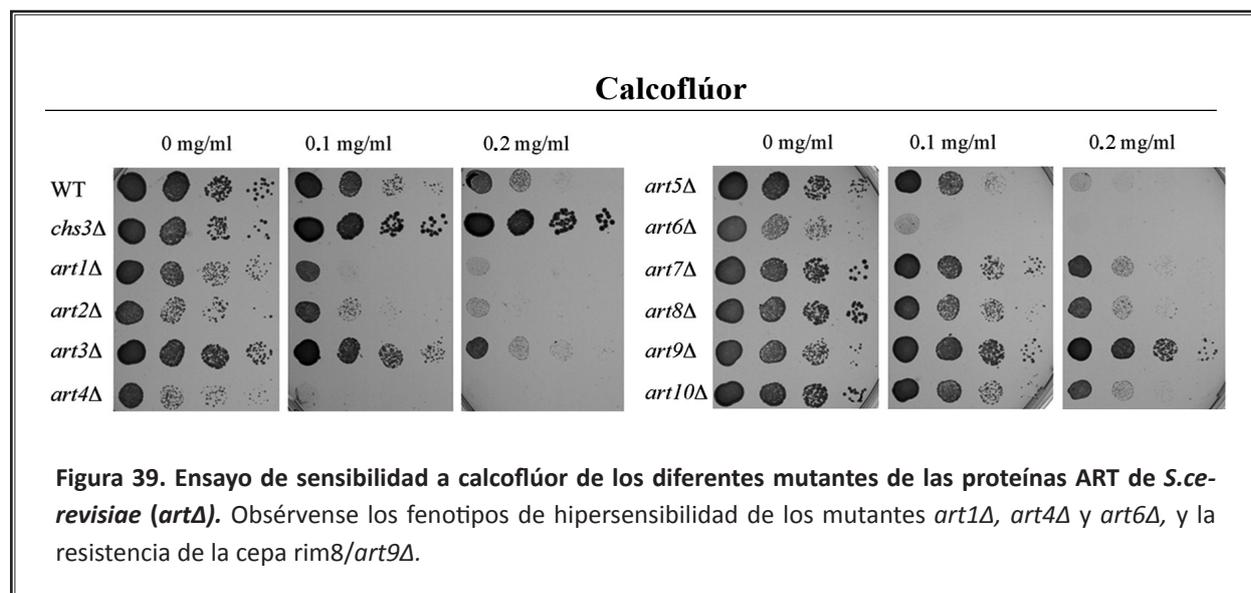
Nuestros resultados nos permiten postular que la ubiquitinación N-terminal de Chs3 es mediada por Rsp5, tiene lugar en la MP y dirige su tráfico por la ruta endosomal tardía. Pero también sugieren que la extensa ubiquitinación de Chs3, adquirida en diferentes niveles, plantea un sistema de regulación postraduccional mucho más complejo.

5. LA UBIQUITIACIÓN DE Chs3 EN LA MP DEPENDE DE LA α -ARRESTINA Rod1/Art4.

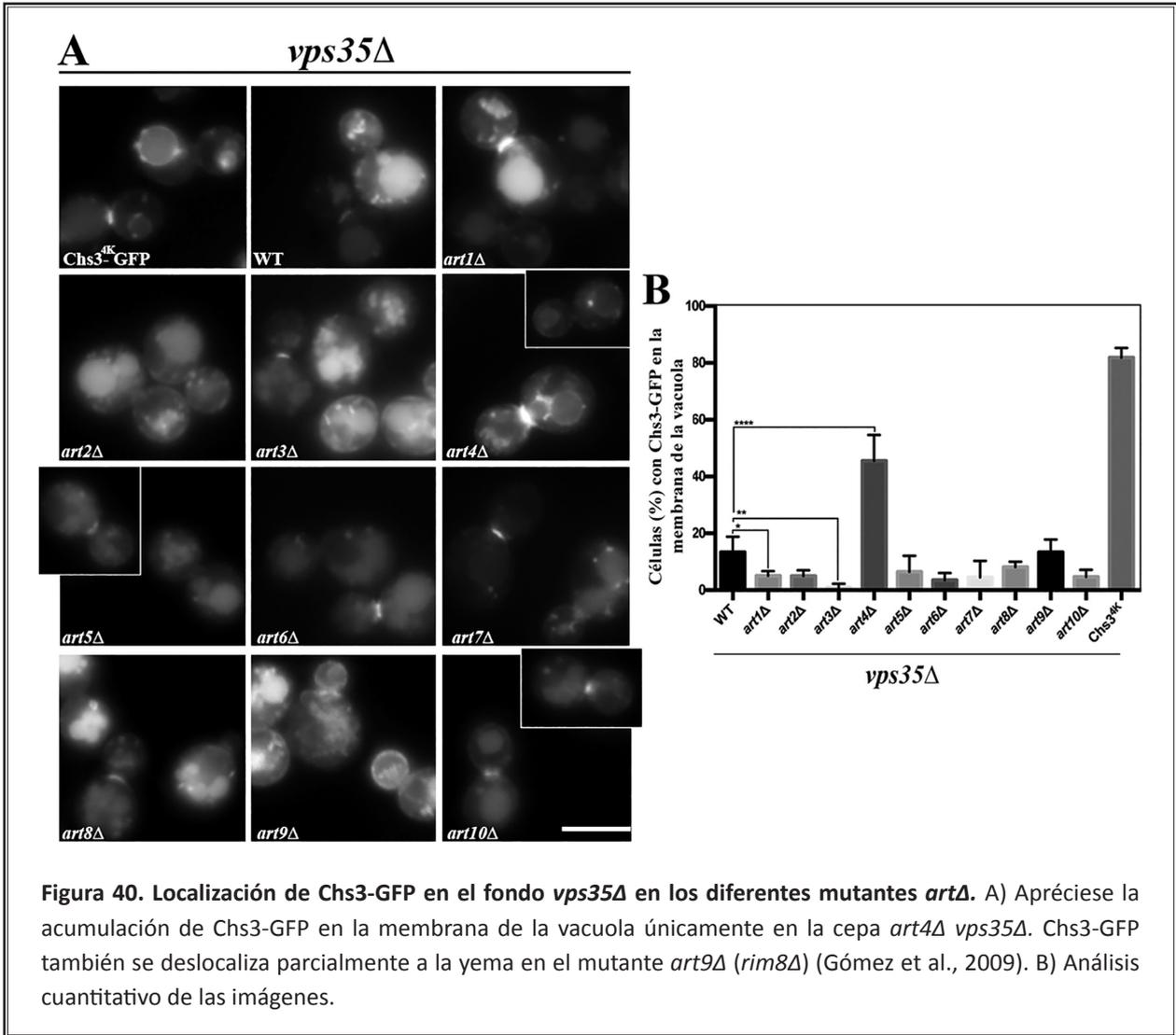
La ubiquitinación por Rsp5 frecuentemente necesita de proteínas adaptadoras para reconocer específicamente a sus sustratos, muy diversos y numerosos. Para elucidar como Rsp5 se unía a Chs3, nosotros enfocamos nuestro estudio en la familia de adaptadores relacionados con las arrestinas o ART (Arrestin-related trafficking adaptors), ya que la mayoría han sido relacionados con la ubiquitinación de proteínas de MP actuando principalmente a este nivel (Nikko and Pelham, 2009).

5.1. Determinación de la proteína ART responsable de mediar la ubiquitinación N-terminal de Chs3.

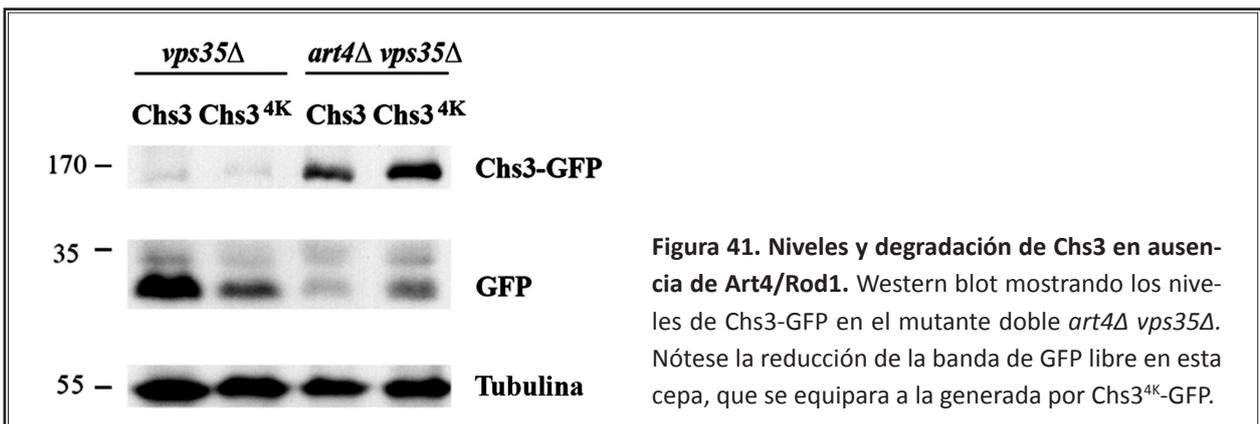
Iniciamos nuestro screening analizando el fenotipo de resistencia o hipersensibilidad a calcoflúor de mutantes en las 10 proteínas ART conocidas en *S.cerevisiae* (mutantes *art* Δ) (Figura 39). El mutante *art9/rim8* Δ resultó resistente a calcoflúor, como ya se había descrito previamente (Gomez et al., 2009). Por el contrario, las cepas *art1* Δ , *art4* Δ y *art6* Δ presentaban un marcado fenotipo de hipersensibilidad a calcoflúor. Estos resultados eran sugerentes, pero difíciles de interpretar, puesto que la hipersensibilidad a calcoflúor puede ser consecuencia de efectos pleiotrópicos de la propia mutación.



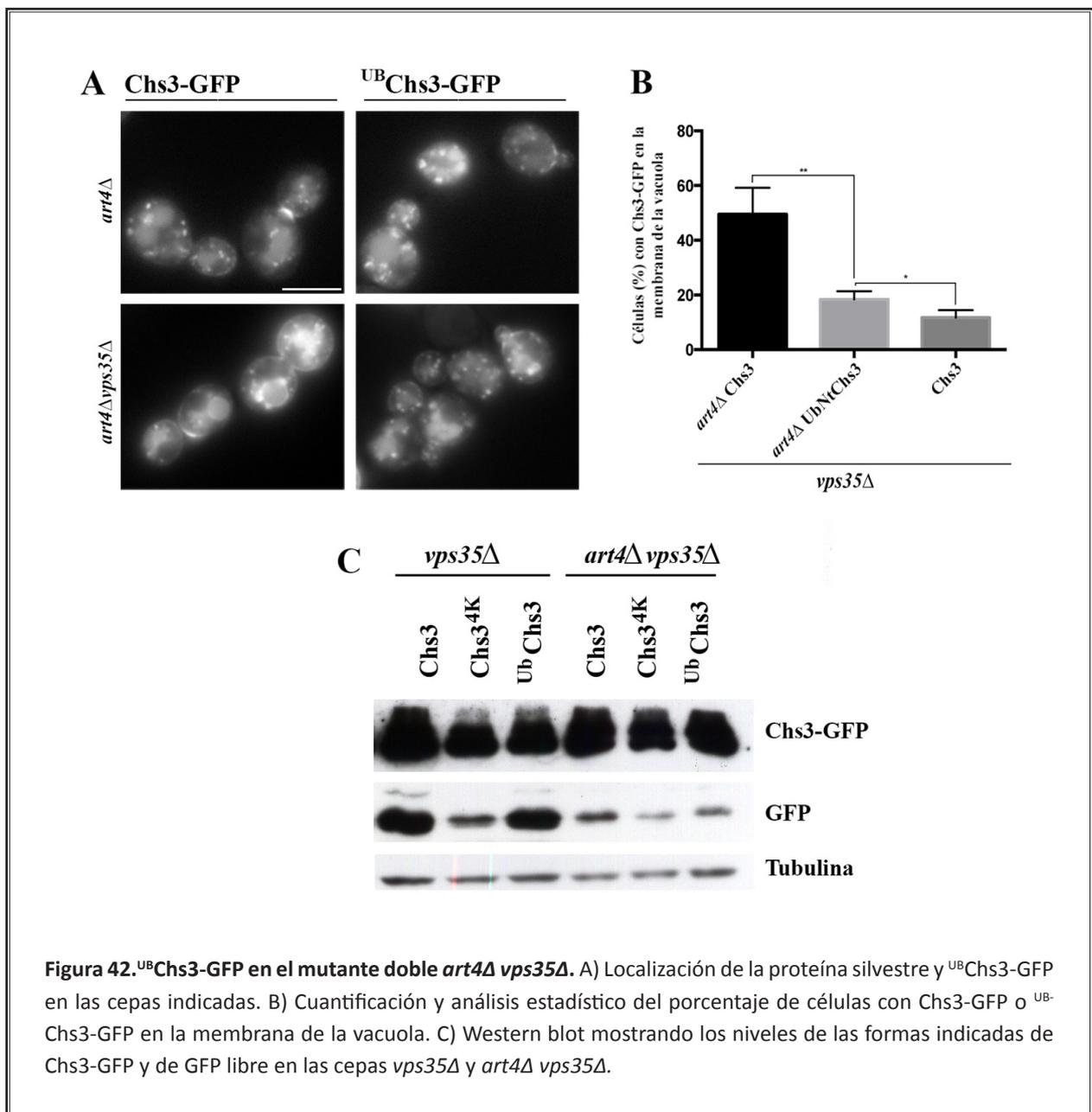
Para estudiar directamente la participación de estas proteínas ART en la ubiquitinación de Chs3, recurrimos a analizar la localización de la proteína silvestre en los mutantes *art* Δ en el fondo genético *vps35* Δ , en el que la proteína queda retenida en la membrana de la vacuola en ausencia de ubiquitinación N-terminal. En la mayor parte de los mutantes dobles, *art* Δ *vps35* Δ , la localización de Chs3 no se veía alterada (Figura 40), a excepción de la cepa *art4* Δ *vps35* Δ en la que Chs3-GFP, de nuevo, quedaba retenida en la membrana de la vacuola en aproximadamente el 50% de las células (Figura 40A y B), un valor próximo al observado para la proteína Chs3^{4K}-GFP empleada como control. Este fenotipo no se observó para ninguno de los otros mutantes *art* Δ .



Confirmamos este resultado analizando por Western blot la intensidad de la banda de GFP liberada tras el procesamiento de Chs3-GFP en la vacuola, proporcional a la degradación de la proteína. En el mutante *vps35Δ*, Chs3 se degrada parcialmente dando lugar a cantidades significativas de GFP libre, cantidades que se reducen drásticamente en la proteína Chs3^{4K}. Esta reducción se observa también para la proteína silvestre en el mutante doble *art4Δ vps35Δ*, que muestra niveles de GFP libres similares a los de la proteína Chs3^{4K}. Estos niveles no se ven reducidos al usar Chs3^{4K} en la cepa *art4Δ vps35Δ* (Figura 41).

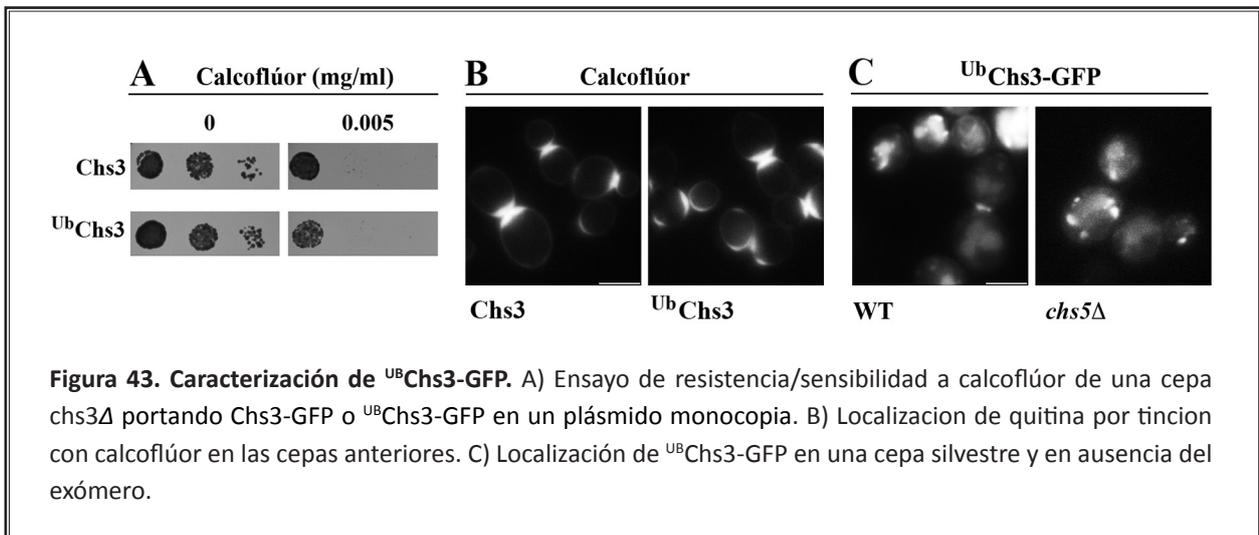


El conjunto de estos resultados asocia así la función de Art4/Rod1 con el tráfico endosomal tardío de Chs3, lo que permite establecer que Art4/Rod1 pudiera ser la proteína ART responsable de la ubiquitinación de Chs3 en su extremo N-terminal. Si este fuera el caso, la introducción de una ubiquitina de manera permanente en el extremo N-terminal de Chs3 (^{UB}Chs3-GFP) revertiría los fenotipos del mutante doble *art4Δ vps35Δ*, promoviendo de nuevo el reconocimiento de la proteína por el ESCRT y su degradación en la vacuola. Tal y como se muestra en la **Figura 42**, ^{UB}Chs3-GFP en la cepa *art4Δ vps35Δ* prácticamente dejaba de localizarse en la membrana de la vacuola para pasar a su interior y ser degradada, confirmando nuestra hipótesis. Sin embargo, no obtuvimos el mismo resultado al analizar por Western blot los niveles de degradación de Chs3. Si bien está claro que en ausencia de Art4/Rod1 en un fondo *vps35Δ* la cantidad de Chs3 que se degrada disminuye debido a su retención en la membrana de la vacuola, la introducción de la ubiquitina permanente en el extremo N-terminal no produjo el aumento esperado de la intensidad de la banda de GFP libre (**Figura 42C**), a pesar de su desaparición de la membrana de la vacuola.



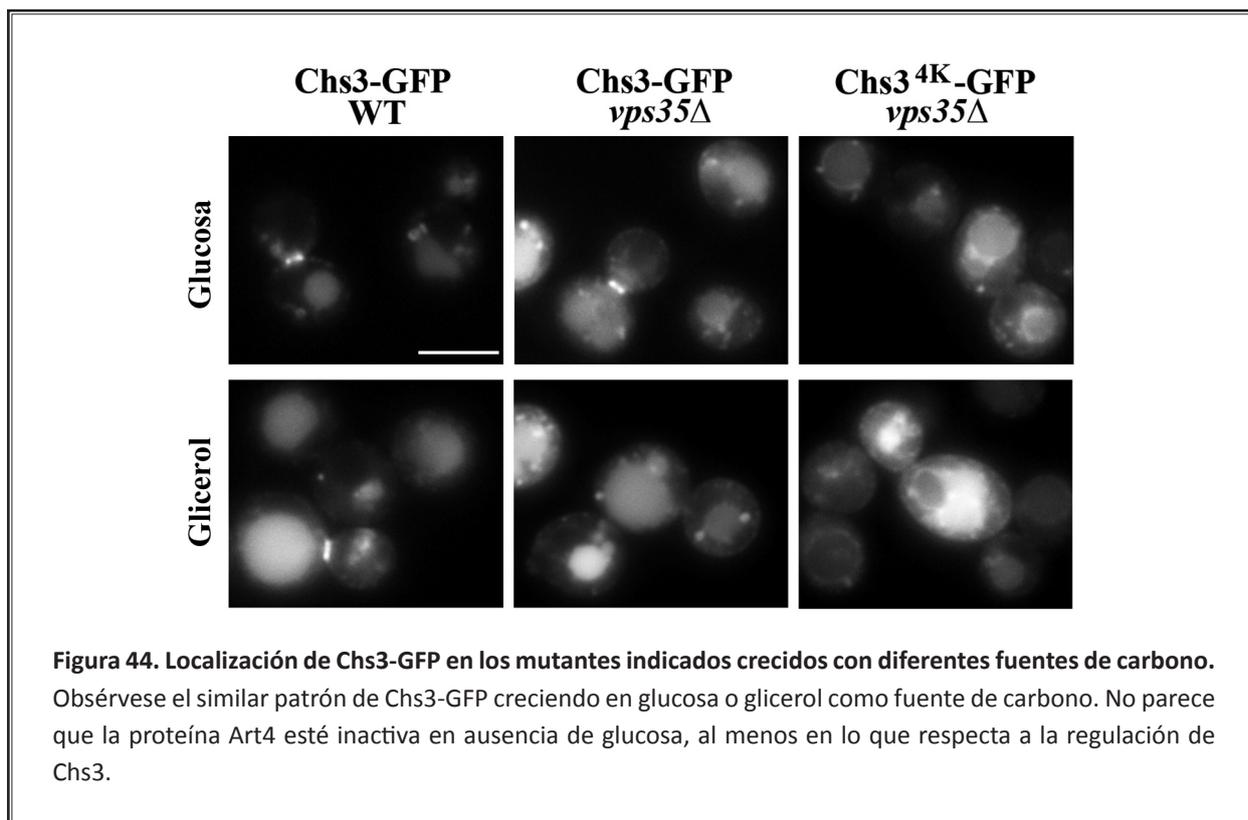
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La explicación de este resultado es compleja. Por una parte, es posible que la señal que dirige el reconocimiento por el complejo ESCRT sea específica y requiera la ubiquitinación de determinadas lisinas (K 118, 119, 123 y 136) y una ubiquitina N-terminal no sea un sustituto completo. Así mismo, la introducción de una ubiquitina permanente puede modificar otras señales, incluida la ubiquitinación de otros residuos, que sean necesarias para un tráfico correcto. Además, ^{Ub}Chs3-GFP presenta una serie de fenotipos que, pese a ser leves, diferencian esta proteína de la silvestre. Así ^{Ub}Chs3-GFP confiere una ligera hipersensibilidad a calcoflúor y una parcial deslocalización de la quitina (**Figura 43A, B**). Sin embargo, su localización es aparentemente similar a la de la proteína silvestre (**Figura 43C**). Por lo tanto, carecemos en este momento de datos concluyentes para explicar este resultado.



5.2. La función de Art4/Rod1 en el tráfico de Chs3 no está regulada por la fuente de carbono.

Se ha demostrado que la proteína ART Art4/Rod1 se regula por fosforilación dependiente de glucosa, que activa la arrestina y promueve la ubiquitinación del transportador Jen1 y su posterior degradación en la vacuola (Becuwe et al., 2012c). Sin embargo, como se muestra en la **Figura 44**, el cambio de glucosa a glicerol como fuente de carbono no produjo ningún cambio en la localización de Chs3-GFP ni Chs3^{4K}-GFP en las cepas silvestre y *vps35Δ*. Además, lo que es más relevante es que no se detectó acumulación de Chs3-GFP en la membrana de la vacuola en el mutante *vps35Δ* crecido en glicerol, en el que se supone que Art4/Rod1 está inactiva. Así pues, estos resultados sugieren que la acción de Art4/Rod1 en el tráfico de Chs3 es independiente de su fosforilación mediada por Snf1, un resultado que es consistente con la existencia de otras múltiples señales que regulan la función de Art4/Rod1 (Alvaro et al., 2014). Es, por lo tanto, posible que Art4/Rod1 simplemente reconozca Chs3 por el cambio conformacional que experimenta la proteína al anclarse en la MP, en un contexto funcional similar al que se ha descrito para la proteína ART Art1 como parte del sistema de control de calidad de proteínas de la MP (Zhao et al., 2013).



5.3. Niveles de ubiquitinación de Chs3 en ausencia de Art4/Rod1.

Como siguiente paso quisimos demostrar bioquímicamente nuestra hipótesis que plantea a Art4/Rod1 como la proteína ART directamente implicada en la ubiquitinación de Chs3 en la MP. En el caso de que nuestra afirmación fuera correcta, la delección de *ART4/ROD1* debería afectar al patrón de ubiquitinación de Chs3. A 25°C el mutante *art4Δ* mostraba un patrón de ubiquitinación de Chs3 relativamente normal, pero carecía completamente de la banda de 176 kDa. Ya hemos visto que esta banda es la que se genera tras la llegada de Chs3 a la MP (**Figura 37**) y que sufre un incremento significativo cuando la proteína se acumula en la MP (**Figura 36**). Tras un cambio a 37°C, la banda de 176 kDa se hizo muy prominente en la cepa silvestre (**Figura 45**), pero continuaba ausente en el mutante *art4Δ*, siendo esta vez la diferencia más clara e indicando que la actividad de Art4/Rod1 era responsable de la ubiquitinación de Chs3 asociada a esta banda. Sorprendentemente, Chs3^{4K}-GFP, fenotípicamente muy similar al mutante *art4Δ* (**Figura 31**), muestra un patrón de ubiquitinación normal con un incremento significativo de la banda de 176kDa a alta temperatura.

Hemos mostrado que el adaptador Art4/Rod1 asiste a la ubiquitina ligasa Rsp5 en la ubiquitinación de Chs3. La similitud entre los fenotipos encontrados para Chs3 en el mutante *art4Δ* y Chs3^{4K}, firmemente sugieren que Art4/Rod1 promueve la ubiquitinación N-terminal de Chs3 que tiene lugar en la MP, siendo así responsable de marcar la proteína para su degradación vacuolar y jugando por tanto un papel fundamental en la regulación del tráfico endosomal tardío de Chs3. Este papel es consistente con la función biológica que se ha propuesto para esta y otras proteínas ART (Becuwe and León 2014; Crapeau et al., 2014; Lin et al., 2008; O'Donnell et al., 2015b). Sin embargo, el patrón de ubiquitinación observado para

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Chs3 en la cepa *art4Δ* es diferente del que presenta la proteína Chs3^{4K}, sugiriendo que Art4/Rod1 media la ubiquitinación de Chs3 en residuos adicionales, cuya función no ha sido determinada aún. Así mismo, el hecho de que Chs3 permanezca parcialmente ubiquitinado en la delección de *ART4/ROD1*, sugiere fuentes adicionales de ubiquitinación. Otro aspecto que también resulta llamativo es que los fenotipos observados de retención en la membrana de la vacuola, por microscopía, y disminución de la banda libre de GFP, por Western blot, asociados a la proteína Chs3^{4K} en *vps35Δ* son más penetrantes que los asociados a la delección de la proteína ART; por ejemplo, el porcentaje de células con señal de Chs3 en la membrana de la vacuola es del 80% para la proteína Chs3^{4K}-GFP y del 50% en la cepa *art4Δ*. Una explicación plausible pudiera ser que la ausencia de la proteína ART altere a otros niveles el tráfico de Chs3 y una menor parte de la proteína llegue a la ruta endosomal tardía. No podemos descartar tampoco, que Art4/Rod1 no sea el único factor implicado en la ubiquitinación N-terminal de Chs3.

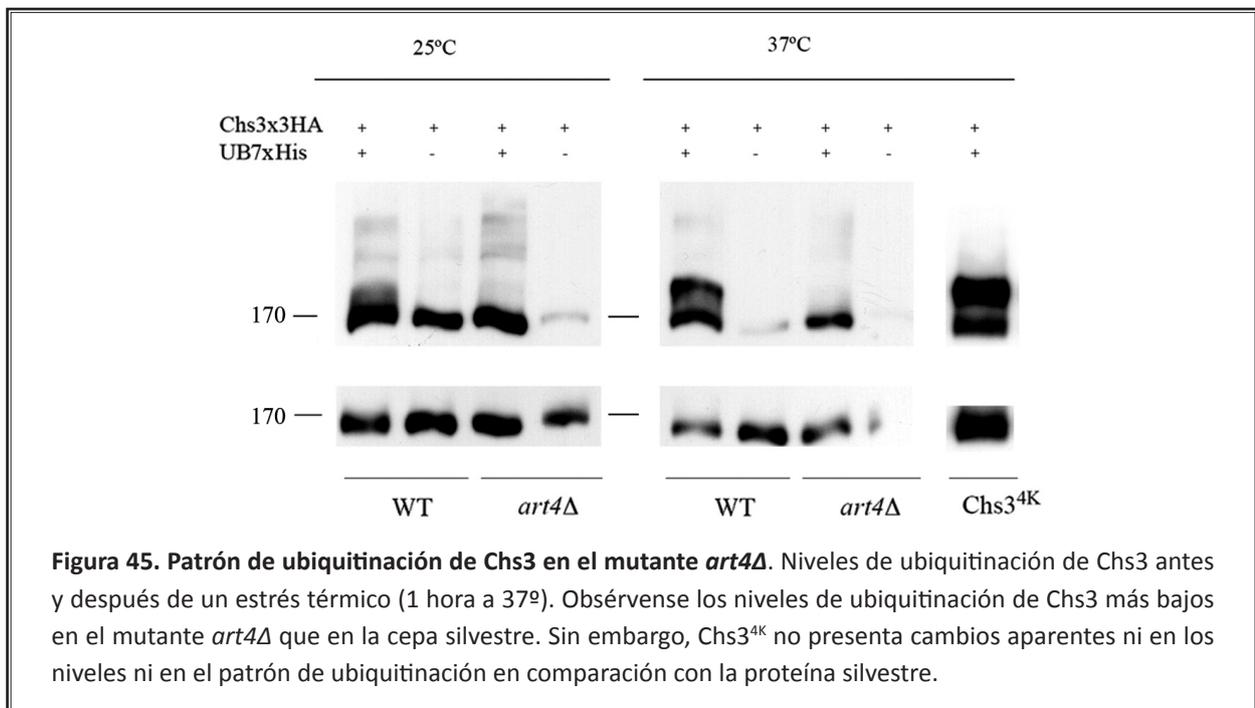


Figura 45. Patrón de ubiquitinación de Chs3 en el mutante *art4Δ*. Niveles de ubiquitinación de Chs3 antes y después de un estrés térmico (1 hora a 37°). Obsérvense los niveles de ubiquitinación de Chs3 más bajos en el mutante *art4Δ* que en la cepa silvestre. Sin embargo, Chs3^{4K} no presenta cambios aparentes ni en los niveles ni en el patrón de ubiquitinación en comparación con la proteína silvestre.

6. EL RECICLADO ENDOSOMAL TARDÍO CONTRIBUYE AL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTÁSIS DE Chs3 TRAS LA RESPUESTA A ESTRÉS.

El correcto tráfico de Chs3 en levaduras depende del mantenimiento de un amplio reservorio de la proteína a nivel de TGN/endosomas tempranos (Valdivia et al., 2002; Ziman et al., 1996). Este reservorio llega a eliminarse prácticamente después de algunas formas de estrés celular (Valdivia and Schekman, 2003), como consecuencia de la acumulación de Chs3 en la MP. Esta acumulación se produce para potenciar el aumento en los niveles de quitina que como ya vimos, refuerza la PC en respuesta a estrés (Levin, 2011).

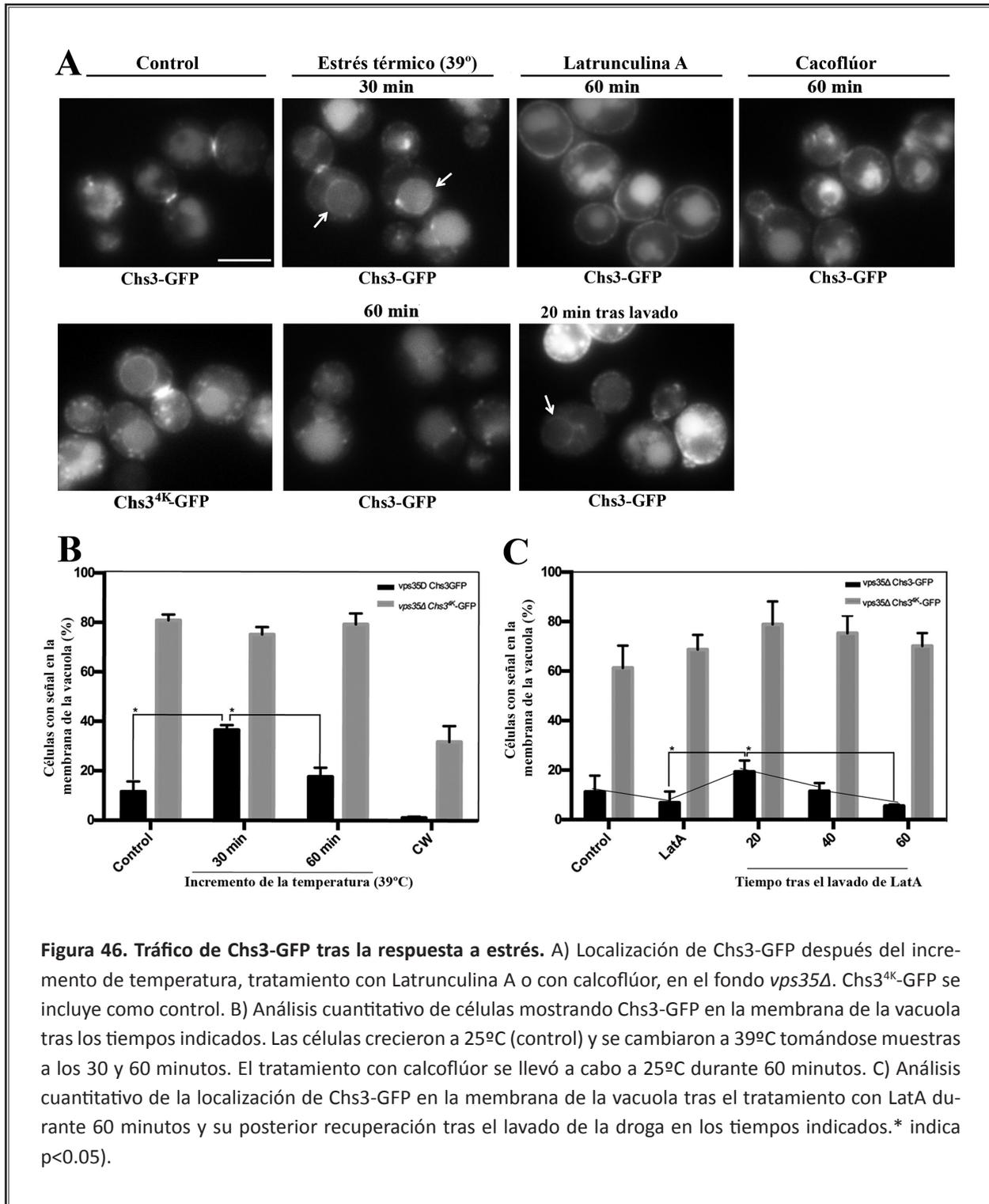
Como decimos, el estrés térmico induce una acumulación transitoria de Chs3 en la MP (**Figura 46A**, nótese la distribución de Chs3 a lo largo de la MP y (Valdivia and Schekman, 2003)), situación que se revierte tras la adaptación de las células a la temperatura más elevada. Además, nosotros hemos mostrado como este aumento de temperatura y acumulación en la MP desencadena un incremento en los niveles de ubiquitinación (**Figura 36**). Si como hemos postulado la ubiquitinación en el extremo N-terminal que adquiere Chs3 en la MP marca la proteína para su reconocimiento por el complejo ESCRT y su posterior degradación en la vacuola, nos preguntamos cómo la célula gestiona esta proteína para que vuelva a su reservorio en TGN/endosomas tempranos en lugar de ser degradada, una vez que se ha adaptado al estrés. Para abordar la cuestión decidimos estudiar la localización de Chs3-GFP después de someter las células a estrés térmico en la cepa *vps35Δ*. Este fondo nos permite saber si la proteína endocitada se incorpora o no en ILVs, ya que en caso negativo, y como ya hemos visto en múltiples ocasiones, se queda retenida en la membrana de la vacuola al faltar el retrómero.

Así pues sometimos las células a estrés térmico (39°C). Como está descrito, Chs3 se relocalizó mayoritariamente en la MP, situación que se revirtió con la adaptación de las células al estrés. Este aumento de la temperatura también promovió una acumulación transitoria pero significativa de Chs3-GFP en la membrana de la vacuola del mutante *vps35Δ* (**Figura 46A, B**). Esta retención de Chs3 en la membrana de la vacuola presentó su máximo a los 30 minutos (35% de las células), disminuyendo después hasta alcanzar los niveles del control pasados los 60 minutos de exposición al calor (**Figura 46B**).

El tratamiento de las células con Latrunculina A (LatA) también desencadena la acumulación de Chs3 en la MP y el agotamiento de su reservorio intracelular (**Figura 46A**, ver también (Reyes et al., 2007)). Este fenotipo se revierte con el lavado de la droga, de manera que el tráfico de Chs3 sufriría un proceso de adaptación equivalente a la adaptación al estrés térmico. En estas condiciones, volvimos a analizar la localización de Chs3 en la cepa *vps35Δ*. Remarcablemente, a los 20 minutos del lavado de LatrunculinaA (fase de adaptación) encontrábamos de nuevo un pico de células con Chs3-GFP localizada en la membrana de la vacuola (**Figura 46C**). Esta acumulación se reducía tras tiempos de incubación más largos en ausencia de la droga. Ambos resultados son coincidentes, señalando que una parte de Chs3 se escapa al reconocimiento por el complejo ESCRT y así no es ni incorporada en ILVs ni degradada. En condiciones normales, esta proteína sería susceptible de ser reciclada por el retrómero, contribuyendo así a la recuperación del reservorio en TGN/endosomas tempranos de Chs3. En las mismas condiciones, y como control, la acumulación de Chs3^{4K}-GFP en la membrana de la vacuola no se vio alterada (**Figura 46**) debido a su incapacidad intrínseca de ser reconocida por el complejo ESCRT.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Sorprendentemente, el tratamiento con calcoflúor, agente causante también de estrés de PC, no promovía esta retención de Chs3-GFP en la membrana de la vacuola que veníamos observando en las condiciones anteriores, disminuyendo además la acumulación de la proteína Chs3^{4K}-GFP en la cepa *vps35Δ* (**Figura 46A, B**). Las razones para estos distintos fenotipos no son claras, pero se puede argumentar que el estrés causado por el calcoflúor permanece en el tiempo, por lo que es probable que la respuesta de la célula sea diferente, y altere de forma distinta la localización de Chs3.



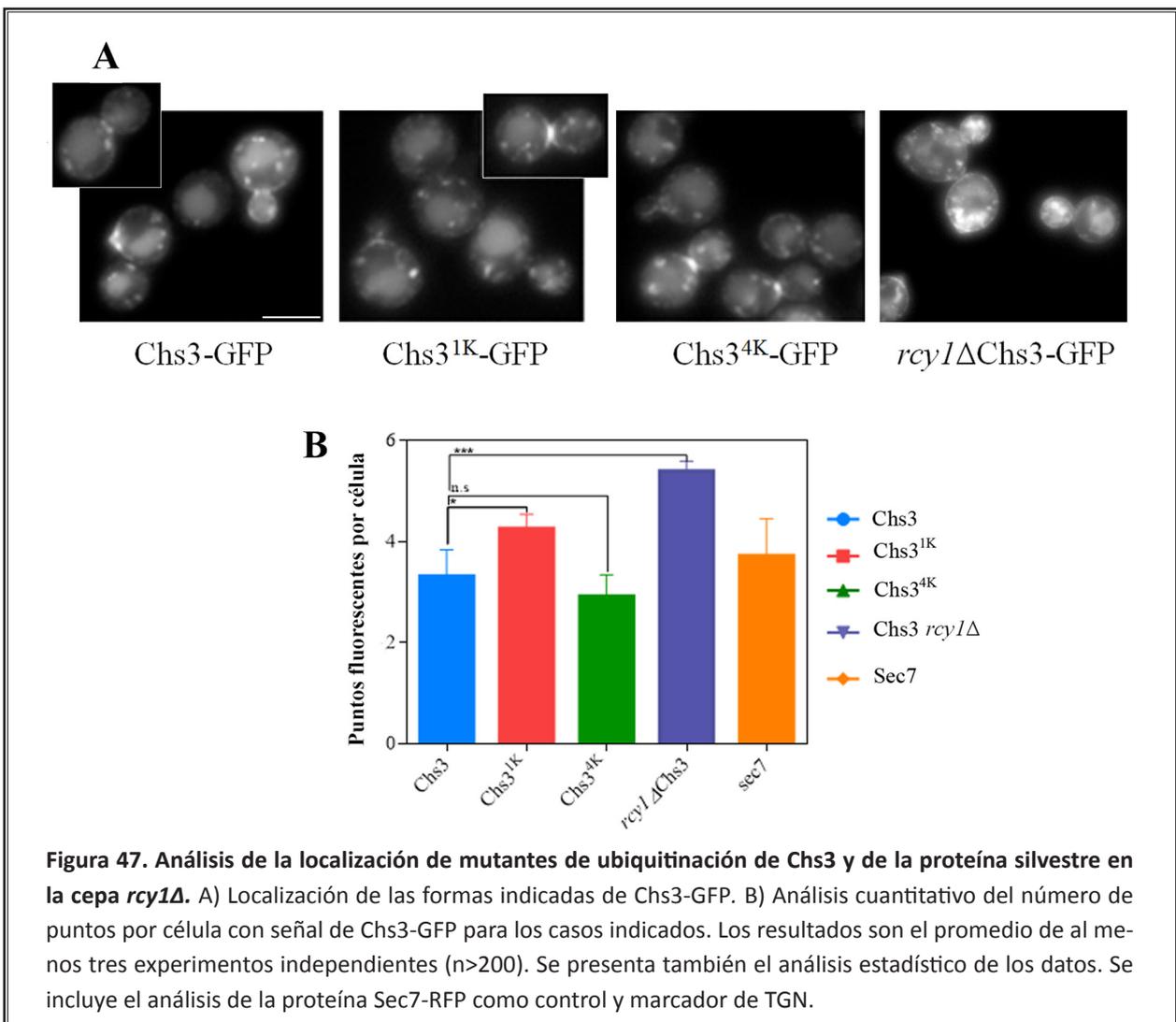
Los resultados obtenidos en la adaptación al estrés térmico o con la liberación del bloqueo por la Latrunculina A, señalan a una fracción de Chs3 que no está siendo correctamente procesada para su degradación, facilitando su reciclado por el retrómero. Lo que todavía no está claro en este momento es si este fallo en la degradación se debe a una ineficiente ubiquitinación de Chs3 tras su masiva acumulación en la MP o simplemente refleja la saturación del complejo ESCRT y la ruta degradativa en estas condiciones. Independientemente de la razón concreta, estos datos situarían el reciclado de Chs3 por el retrómero en endosomas tardíos como un mecanismo complementario y de salvaguarda para recuperar el reservorio intracelular de la proteína tras la respuesta a estrés, que de otra forma se degradaría completamente comprometiendo la integridad celular durante la progresión del ciclo una vez restaurado el crecimiento. Así, la regulación de la degradación de Chs3, en combinación con el reciclado en endosomas tardíos, parece ser un mecanismo que contribuye activamente al mantenimiento de la homeostasis de Chs3.

7. LA UBIQUITINACIÓN DE LA LISINA DEL EXTREMO C-TERMINAL DE Chs3 REGULA SU RECI- CLADO A TRAVÉS DE ENDOSOMAS TEMPRANOS /TGN.

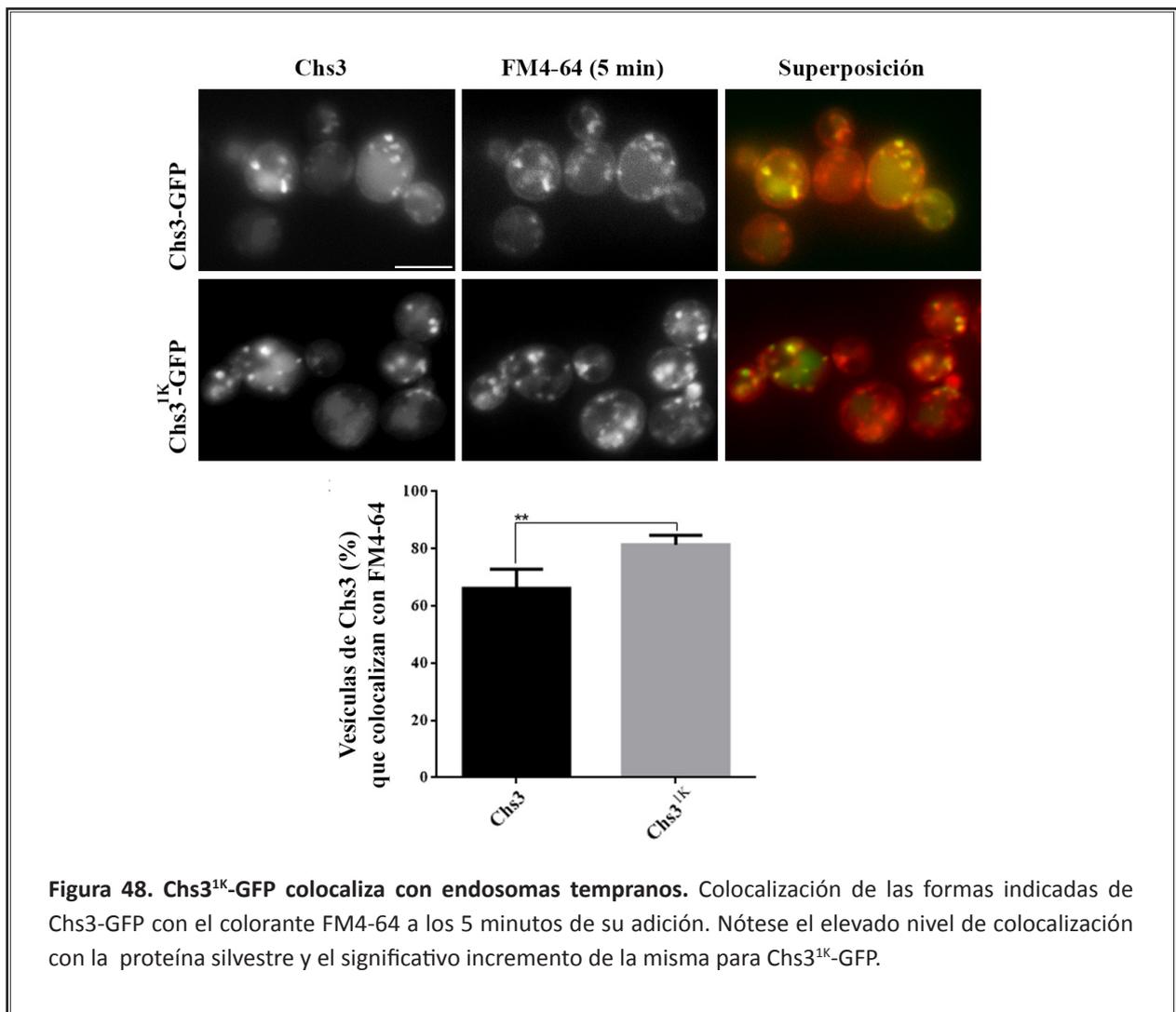
7.1. Caracterización de la proteína Chs3^{K1157R}

Como ya se anticipó en el apartado 3 de Resultados, el estudio de la localización de las proteínas Chs3 deficientes en ubiquitinación reveló que aquellas en las que la lisina 1157 había sido sustituida por argini- na presentaban una aparente mayor intensidad de fluorescencia en vesículas intracelulares. Esta observa- ción sugería un tráfico intracelular alterado que nos llevó a estudiar en mayor profundidad la localización de la proteína Chs3^{1K} (Chs3^{K1157R}) en comparación con la proteína silvestre y Chs3^{4K}.

Este análisis más detallado nos permitió detectar en una cepa silvestre un aumento significativo en el número de puntos intracelulares en los que se localizaba Chs3^{1K}-GFP (**Figura 47A**). Mientras que las célu- las que portan la proteína silvestre o Chs3^{4K}-GFP presentan alrededor de 3 puntos por célula (3.32±0.21 y 2.91±0.21, respectivamente), en el caso de Chs3^{1K}-GFP éstas superaban los 4 (4.3±0.16), siendo esta diferencia estadísticamente significativa (**Figura 47B**). Este resultado sugería que la falta de ubiquitinación C-terminal podía estar comprometiendo el reciclado temprano de esta proteína.

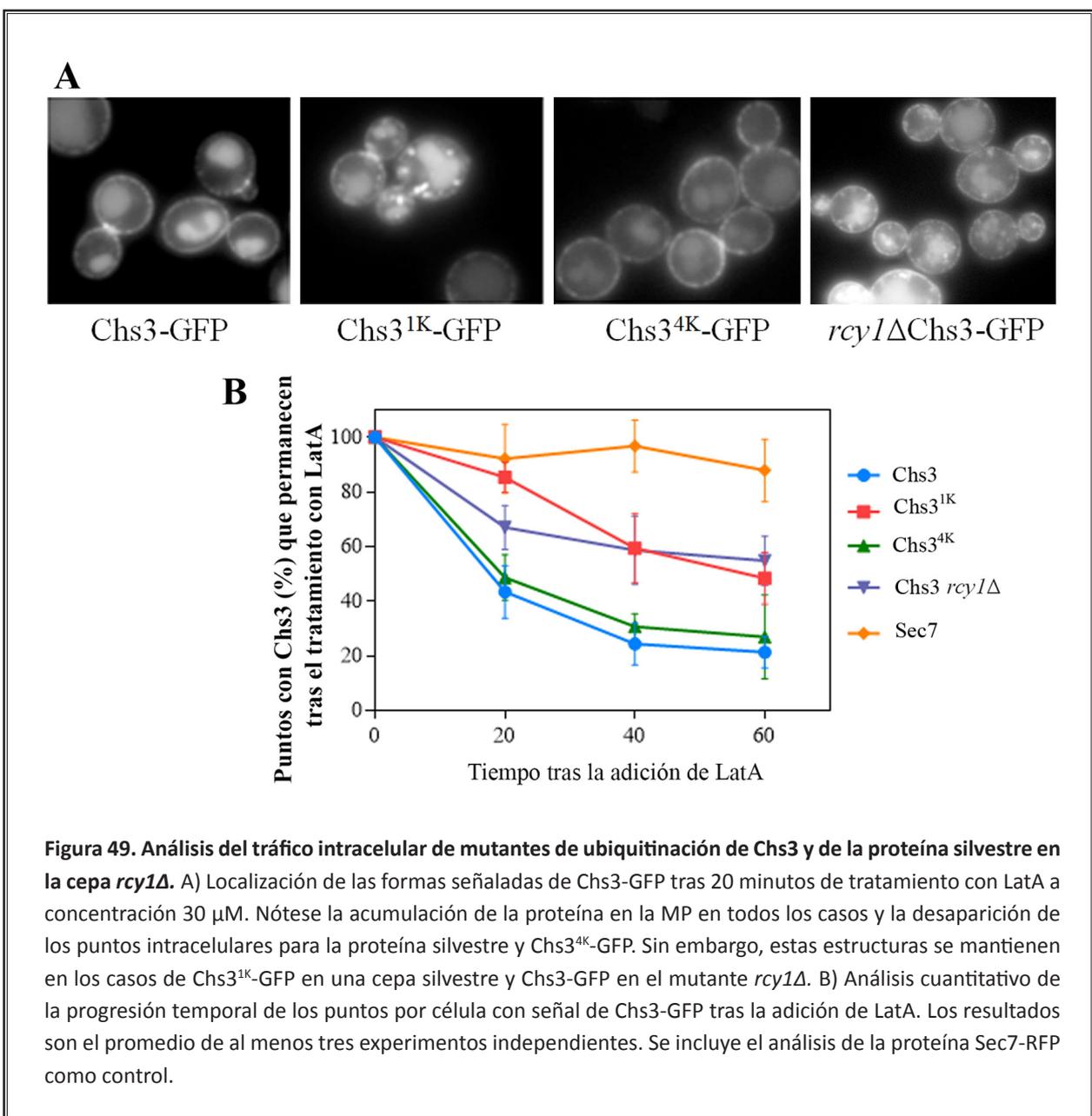


Si el reciclado temprano de Chs3^{1K}-GFP estuviera afectado, esperaríamos que la retención de la proteína se produjera en endosomas tempranos/TGN. Para determinar si los puntos internos donde se acumulaba correspondían con endosomas tempranos/TGN, estas mismas cepas silvestres expresando Chs3-GFP o Chs3^{1K}-GFP se tiñeron con el colorante fluorescente FM4-64 durante 5 minutos. En estas condiciones, el FM4-64 marca los endosomas tempranos (Vida and Emr, 1995) (**Figura 48**). Para la proteína silvestre la co-localización entre la señal de GFP y la de FM4-64 era de un 66.15%±3.84. Este alto nivel de superposición nos lleva a pensar que probablemente este colorante a los 5 minutos no sólo tiñe endosomas tempranos si no también TGN, debido a la estrecha relación que existe entre estos dos compartimentos. Estos niveles de co-localización, además, estarían de acuerdo con la ya descrita localización mayoritaria de Chs3 en este reservorio. Por su parte, la señal de Chs3^{1K}-GFP se superpone con la de FM4-64 en más de un 80% de los puntos por célula (81.35%±1.66), pudiéndose asociar este significativo aumento con una mayor acumulación de la proteína en endosomas tempranos/TGN (**Figura 48**).



7.2. Papel de Rcy1 en el tráfico de Chs3.

Este fenotipo no es nuevo, Chen et al., describieron en 2011 una retención similar en endosomas tempranos para la SNARE Snc1, proteína cuyo tráfico intracelular destaca, como Chs3, por su reciclado de endosomas tempranos a TGN. Su bloqueo en endosomas tempranos dependía también de una señal de ubiquitinación, en este caso en la lisina K63 de Snc1, mediada por la proteína Rcy1. Así, postularon que Rcy1, efector de la ruta de las GTPasas de la familia Rab Ypt31/32 (Chen et al., 2005), contiene un dominio F-box que actuaría como adaptador del complejo Skp1-Cullen-F-box (SCF) mediando de esta manera la ubiquitinación de Snc1 en los endosomas tempranos, señal imprescindible para el progreso de la proteína de endosomas tempranos a TGN (Chen et al., 2011).

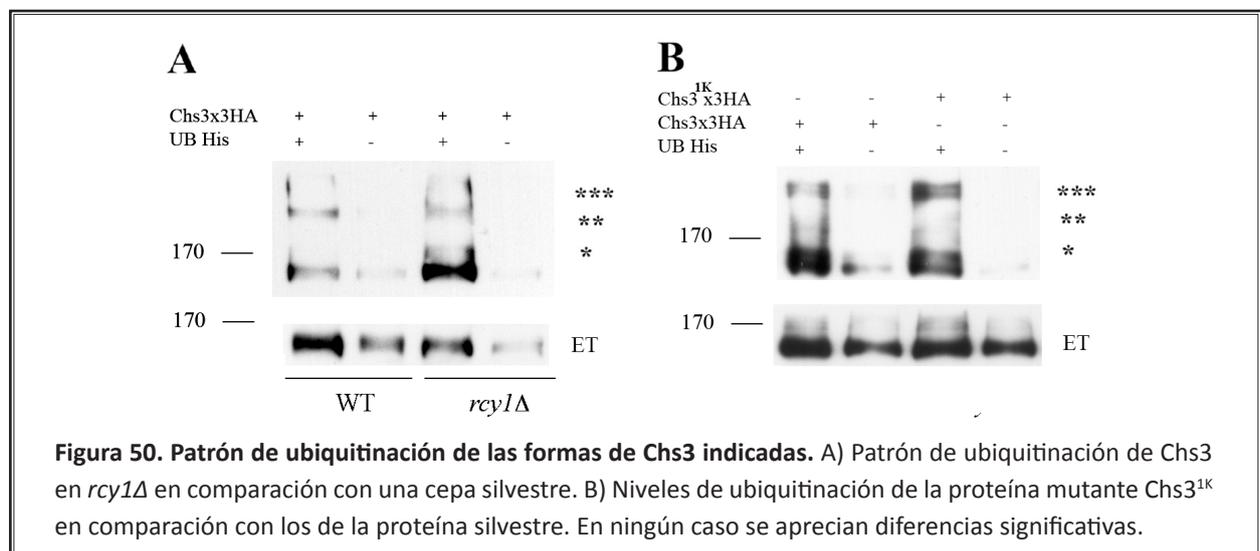


Basándonos en este trabajo previo, decidimos investigar si Rcy1 también tenía un papel en el reciclado de Chs3. Así, estudiamos la localización de la proteína silvestre Chs3-GFP en la cepa mutante *rcy1Δ* (**Figura 47A**). En este caso, la retención de la proteína resultó ser incluso más evidente, llegando a superar los 5 puntos por célula (5.39 ± 0.116) (**Figura 47B**) y sugiriendo un papel para Rcy1 en el tráfico de Chs3 similar al que ejercía para Snc1.

Para comprender mejor la naturaleza de esta retención en endosomas tempranos/TGN, se decidió tratar las células con Latrunculina A. Esta droga, como ya mencionamos, despolimeriza la actina inhibiendo la endocitosis, de manera que nos permitiría seguir el reciclado de la proteína que se encontrara en los compartimentos intracelulares antes de su adición. En condiciones silvestres, la proteína de nueva síntesis sería transportada de TGN a la membrana plasmática quedando allí retenida, y el avance de la proteína localizada en endosomas tempranos a TGN y de aquí a la MP, sería reflejo de la resolución y desaparición de las vesículas intracelulares. Como se aprecia en la **Figura 49**, este fue el caso para las proteínas Chs3-GFP y Chs3^{4K}-GFP, en las que el número de puntos intracelulares cae a menos de la mitad ya a los 20 minutos de la adición de la Latrunculina A, llegando a menos del 20% a los 60 minutos de tratamiento (**Figura 49B**). Sin embargo, para la proteína Chs3^{1K}-GFP o Chs3-GFP en la cepa *rcy1Δ*, la resolución de estos puntos era más lenta y menor, observándose todavía entre un 50 y 60% de los puntos a los 60 minutos de tratamiento.

Estos resultados muestran inequívocamente que la ubiquitinación del extremo C-terminal de Chs3 en la lisina K1157 regula el reciclado de la proteína, ya que en su ausencia ésta queda retenida en endosomas tempranos/TGN. Este resultado es destacable porque refleja cómo dos señales de ubiquitinación diferentes (N- y C-terminales) dirigen el tráfico de una misma proteína por dos vías distintas: la ubiquitinación N-terminal (Chs3^{4K}-GFP) a través de la ruta del cuerpo multivesicular a la vacuola y la ubiquitinación C-terminal (Chs3^{1K}-GFP) el reciclado a través de endosomas tempranos.

Así mismo, estos resultados sugieren un papel de la proteína Rcy1 en la ubiquitinación de Chs3 de la misma manera que se ha propuesto para Snc1(Chen et al., 2011). Para confirmar esta última hipótesis se analizaron los niveles de ubiquitinación de Chs3 en una cepa *rcy1Δ*, empleando la misma técnica de purificación de proteínas ubiquitinadas mediante la resina Co²⁺TALON previamente utilizada. Sin embargo, no detectamos diferencias significativas ni en el patrón ni en los niveles de ubiquitinación de Chs3 en el mu-



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

tante *rcy1Δ* en comparación con la cepa silvestre (**Figura 50A**). Tampoco observamos cambios significativos en la ubiquitinación de la proteína Chs3^{1K}-GFP (**Figura 50B**), cambios tampoco detectables cuando analizá- bamos el patrón de Chs3^{4K}-GFP (Resultados 4). Una explicación plausible, a la vista de los claros fenotipos de estas proteínas, es que tanto la ubiquitinación del extremo N-terminal como la del C-terminal de Chs3 se corresponderían con monoubiquitinación, difícilmente detectable bioquímicamente, y que esto mismo sea lo que suceda en el caso de *rcy1Δ*.

Sin embargo, la interpretación de estos resultados debe de hacerse con precaución ya que el papel de Rcy1 en la célula aún no está claro. En 2012, Sun et al., observaron que la delección de *RCY1* daba lugar a la aparición de compartimentos intracelulares aberrantes derivados de endosomas tempranos y muy ricos en fosfatidilserina (PS), que en condiciones normales se encuentra mayoritariamente limitada a la MP, donde se ensamblaba dinámicamente la maquinaria endocítica. La composición lipídica de las membranas es fundamental para el anclaje de los múltiples elementos que participan en el transporte de proteínas; así, la retención de Snc1 o Chs3 en estos endosomas tempranos aberrantes del mutante *rcy1Δ* podría deberse no a un fallo en la ubiquitinación, sino a un fallo en el anclaje de la maquinaria que participa en el reciclado de estas proteínas al modificarse la composición lipídica de las membranas. Un estudio más profundo de esta cepa es necesario para acabar de esclarecer el papel de Rcy1 en la levadura.

7.3. Caracterización del tráfico endosomal temprano en los mutantes carentes de ubiquitinación de Chs3.

Decidimos extender nuestro estudio del bloqueo en el reciclado a los múltiples mutantes de ubiquitinación creados para Chs3. El análisis de los fenotipos de sensibilidad a calcoflúor mostró que todas aquellas cepas que portaban Chs3 con la lisina K1157 sustituida por arginina eran parcialmente resistentes a calcoflúor (**Figura 51**). Este fenotipo ahora lo podíamos asociar claramente con el bloqueo del reciclado de la proteína y su acumulación en endosomas tempranos/TGN. Sin embargo, la proteína Chs3^{K492-723R}, que tenía mutadas sólo las lisinas centrales (492/511/586/592/612/702/723) también compartía este fenotipo de resistencia parcial (**Figura 51**).

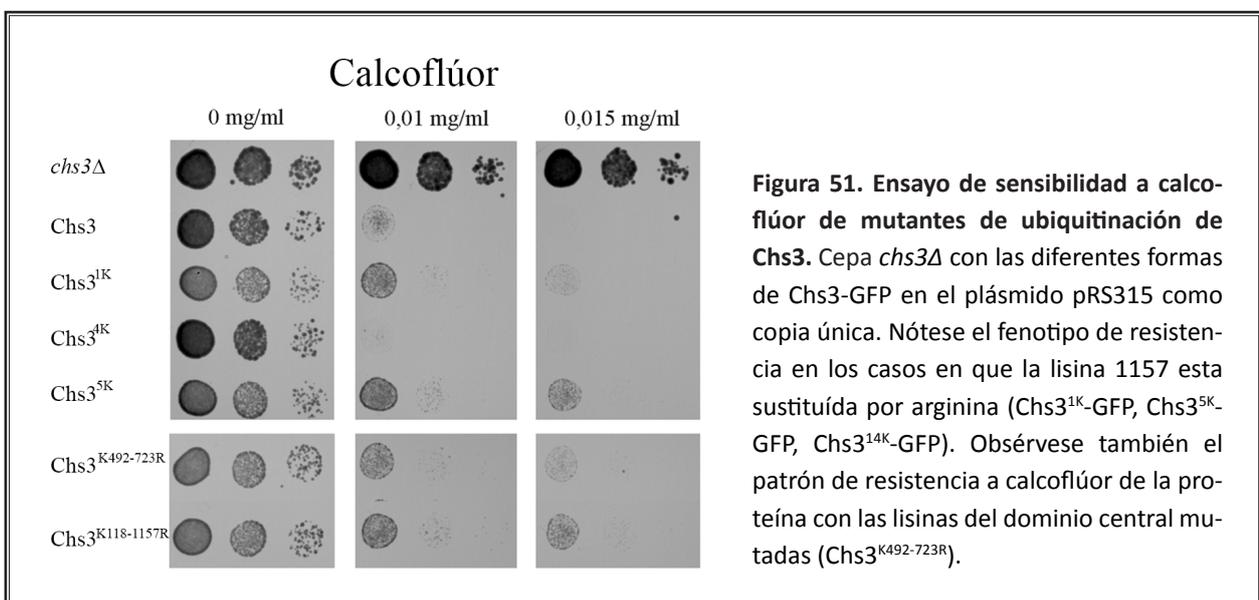
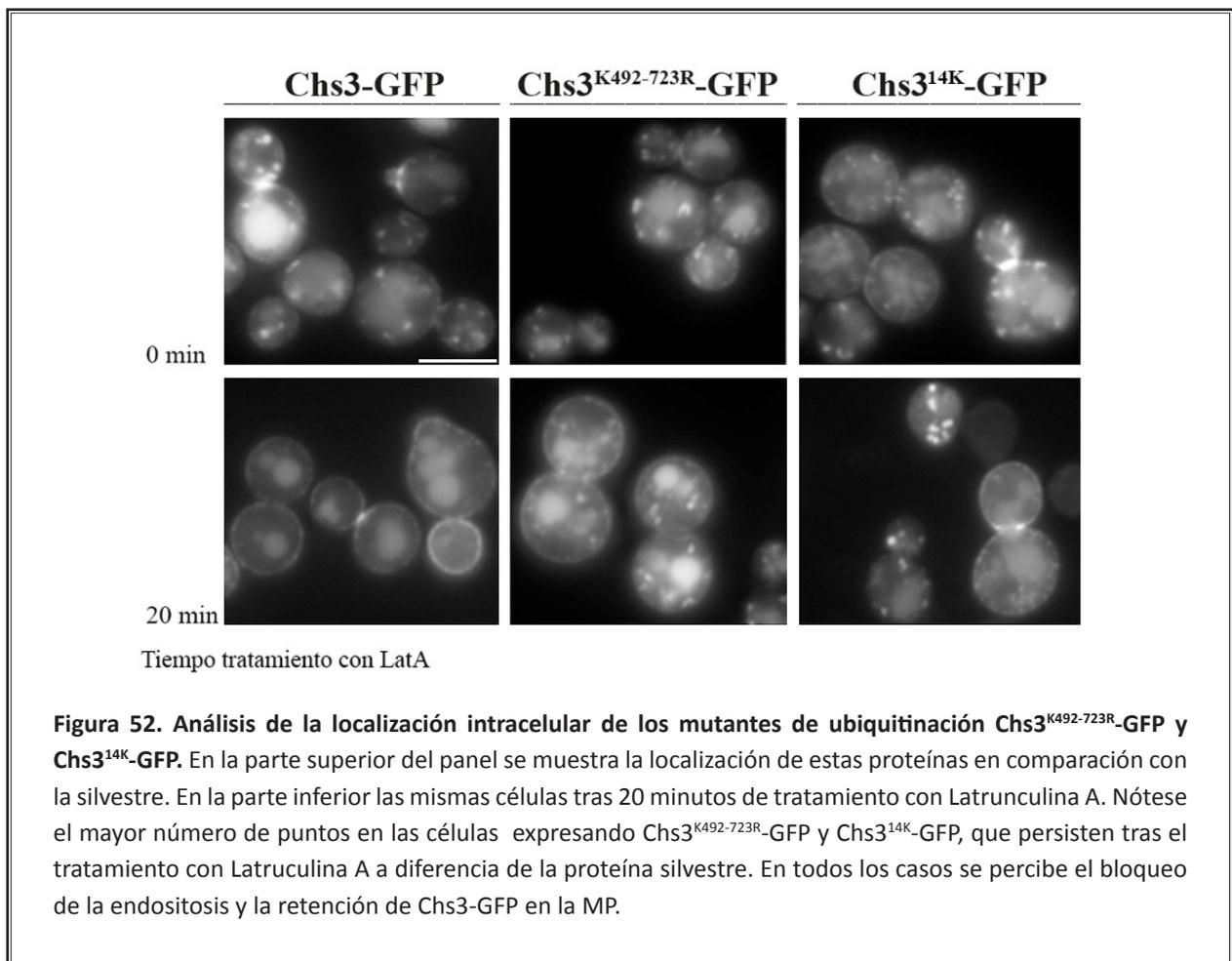


Figura 51. Ensayo de sensibilidad a calcoflúor de mutantes de ubiquitinación de Chs3. Cepa *chs3Δ* con las diferentes formas de Chs3-GFP en el plásmido pRS315 como copia única. Nótese el fenotipo de resistencia en los casos en que la lisina 1157 esta sustituida por arginina (Chs3^{1K}-GFP, Chs3^{5K}-GFP, Chs3^{14K}-GFP). Obsérvese también el patrón de resistencia a calcoflúor de la proteína con las lisinas del dominio central mutadas (Chs3^{K492-723R}).

El análisis de la localización de Chs3^{K492-723R}-GFP y Chs3^{14K}-GFP volvió a mostrar un aumento en el número de puntos intracelulares (4.54 ± 0.75 y 4.75 ± 1.09 respectivamente) que no se resolvían tras el tratamiento con Latrunculina A, sugiriendo de nuevo el bloqueo del tráfico de estas proteínas en endosomas tempranos/TGN (**Figura 52**). Este resultado, esperable en el caso de Chs3^{14K}-GFP, no lo era tanto para la proteína Chs3^{K492-723R}-GFP que sí porta la lisina C-terminal 1157. Sin embargo, se puede postular, que de manera similar a lo que proponíamos para el reconocimiento por el complejo ESCRT, en el que la ubiquitinación N-terminal de Chs3 es la señal imprescindible para dirigir este reconocimiento pero puede estar amplificada por otras lisinas ubiquitinadas, de igual manera, la ubiquitinación de las lisinas centrales puede estar amplificando la señal marcada por la ubiquitinación C-terminal de Chs3 (K1157), y al suprimirlas todas, recopilar su fenotipo.



8. EL BLOQUEO DE Chs3^{1K} EN ENDOSOMAS TEMPRANOS/TGN ESTÁ RELACIONADO CON EL PAPEL DEL ADAPTADOR DE CLATRINA GGA1.

El transporte bidireccional entre el TGN y los endosomas depende de la clatrina. Sin embargo, la clatrina carece de dominios de unión a la membrana, por lo que su reclutamiento desde el citoplasma a la vesícula depende de adaptadores, que además median la interacción con las proteínas cargo (Copic et al., 2007). En *S.cerevisiae* se han descrito tres tipos de adaptadores: el complejo AP-1, las proteínas GGA (Gga1 y Gga2) y las proteínas de tipo epsina Ent3 y Ent5. Se ha establecido que todos estos adaptadores cooperan en el tráfico de cargos entre endosomas y TGN. Sin embargo, la amplia red de interacciones entre ellos, tanto a nivel de interacciones físicas como aparente solapamiento de funciones, hace difícil definir una función específica para cada uno de ellos (Costaguta et al., 2006).

Lo que sí se sabe, es que todos estos adaptadores participan en el tráfico de Chs3 de endosomas a TGN, aunque de nuevo su papel específico se desconoce. Su implicación se ha relacionado con la supresión del fenotipo de resistencia a calcoflúor que ocasiona la delección de los componentes del exómero, Chs5 o Chs6, al bloquear la proteína Chs3 en el TGN. La delección conjunta de *CHS5* o *CHS6* con la de alguna subunidad del complejo AP-1, *gga1 Δgga2Δ* o *ent3Δ ent5Δ* reestablece la sensibilidad a calcoflúor, ya que la proteína es capaz de alcanzar la MP por la denominada ruta alternativa, independiente del exómero (Copic et al., 2007; Starr et al., 2012).

Todas estas premisas junto con la retención de la proteína Chs3^{1K} a nivel de TGN/endosomas tempranos, donde justamente actuarían estos adaptadores, nos llevó a plantear que el defecto que observábamos en ausencia de la ubiquitinación C-terminal de Chs3 podía estar relacionado con la función de alguno de ellos.

8.1. Colocalización de Chs3 y Chs3^{1K} con los adaptadores de clatrina.

Como primer abordaje llevamos a cabo un análisis de colocalización de la proteína silvestre Chs3-GFP y la mutante Chs3^{1K}-GFP con los diferentes adaptadores de clatrina fusionados a la proteína fluorescente mCherry: Aps1 (subunidad pequeña α 1 del complejo AP-1), Gga1, Ent3 y Ent5 (ya que se ha descrito divergencia en su función). También incluimos Chs5, componente del exómero, porque no podíamos descartar que la retención se debiera a un problema de interacción con este complejo. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía confocal empleando el equipo Spinning Disk, optimizando las condiciones para cada fluorocromo, pero priorizando la velocidad en la adquisición de las imágenes. Además, se tomaron tres planos en Z para capa campo y fluorocromo, generando después la proyección máxima (**Figura 53A**). De esta manera se buscaba reducir la imprecisión en las medidas de colocalización derivada de la alta dinámica propia de las vesículas. El análisis posterior se llevó a cabo empleando funciones específicas de los programas Imaris y Matlab que permitían el análisis semiautomático de la colocalización de las vesículas (**Figura 53B**). Este análisis sólo reveló diferencias significativas en los niveles de colocalización de Chs3 y Chs3^{1K} con los adaptadores Ent5 y AP-1. Así, el porcentaje de vesículas con la proteína silvestre Chs3-GFP que presentaba solapamiento con las vesículas en las que residía Ent5mCherry era mayor que el de las vesículas con la proteína Chs3^{1K}-GFP. Sin embargo, ocurría lo contrario en el caso del complejo AP-1, donde el porcentaje de vesículas de Chs3^{1K}-GFP que colocalizaban con vesículas de Aps1mCherry era significati-

vamente mayor que el de las vesículas con la proteína silvestre (**Figura 53B**). En general, se observa que el nivel de colocalización de Chs3 con el complejo AP-1 es significativamente menor que con el resto de adaptadores (aproximadamente un 30% de colocalización frente a un 60%). Esto se puede asociar con un posible papel como donador de cargos de este complejo, mediando por ejemplo el paso de Chs3 de los endosomas tempranos al exómero situado en el TGN. De esta manera, el bloqueo del tráfico de Chs3^{1K}-GFP a este nivel, también implicaría una permanencia más prolongada junto a AP-1 en endosomas tempranos, al no tener lugar el paso siguiente. Estos resultados si bien sugerentes, eran poco concluyentes.

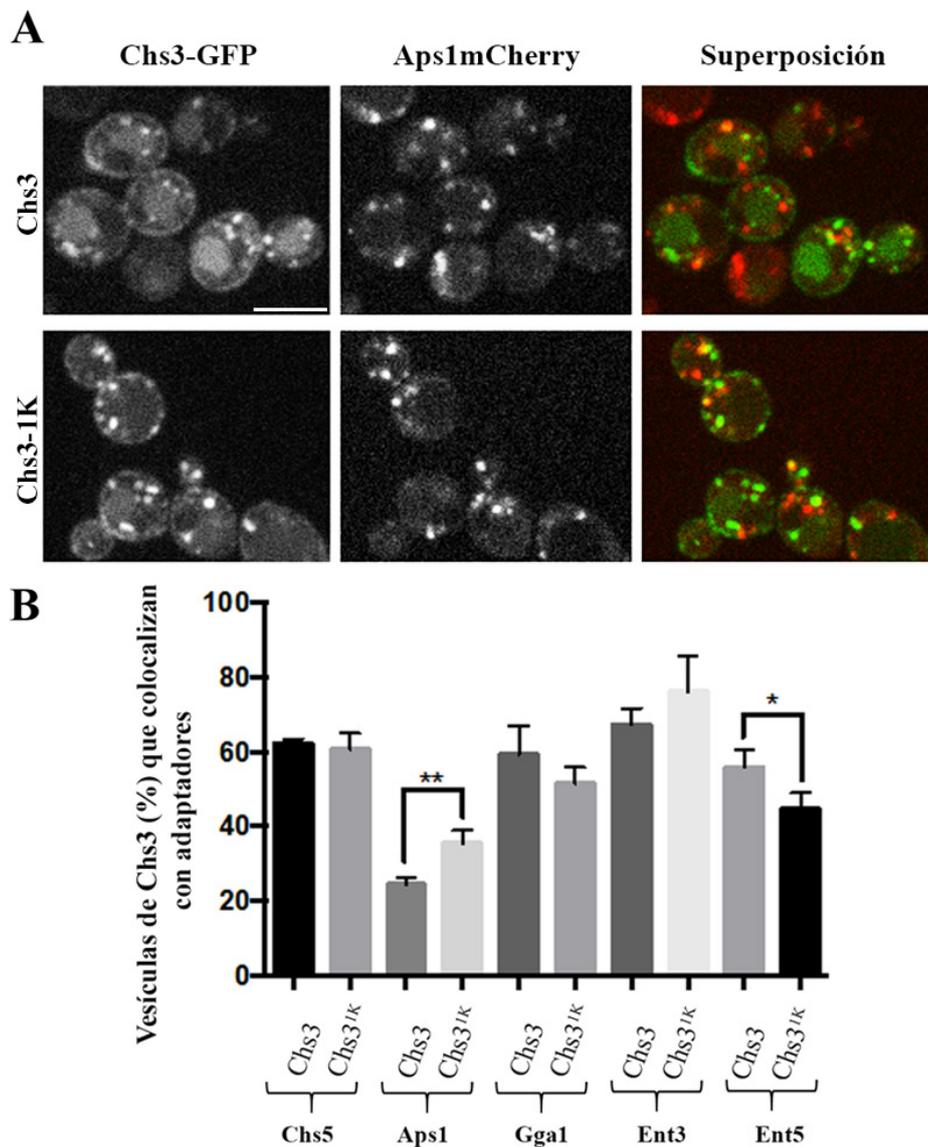
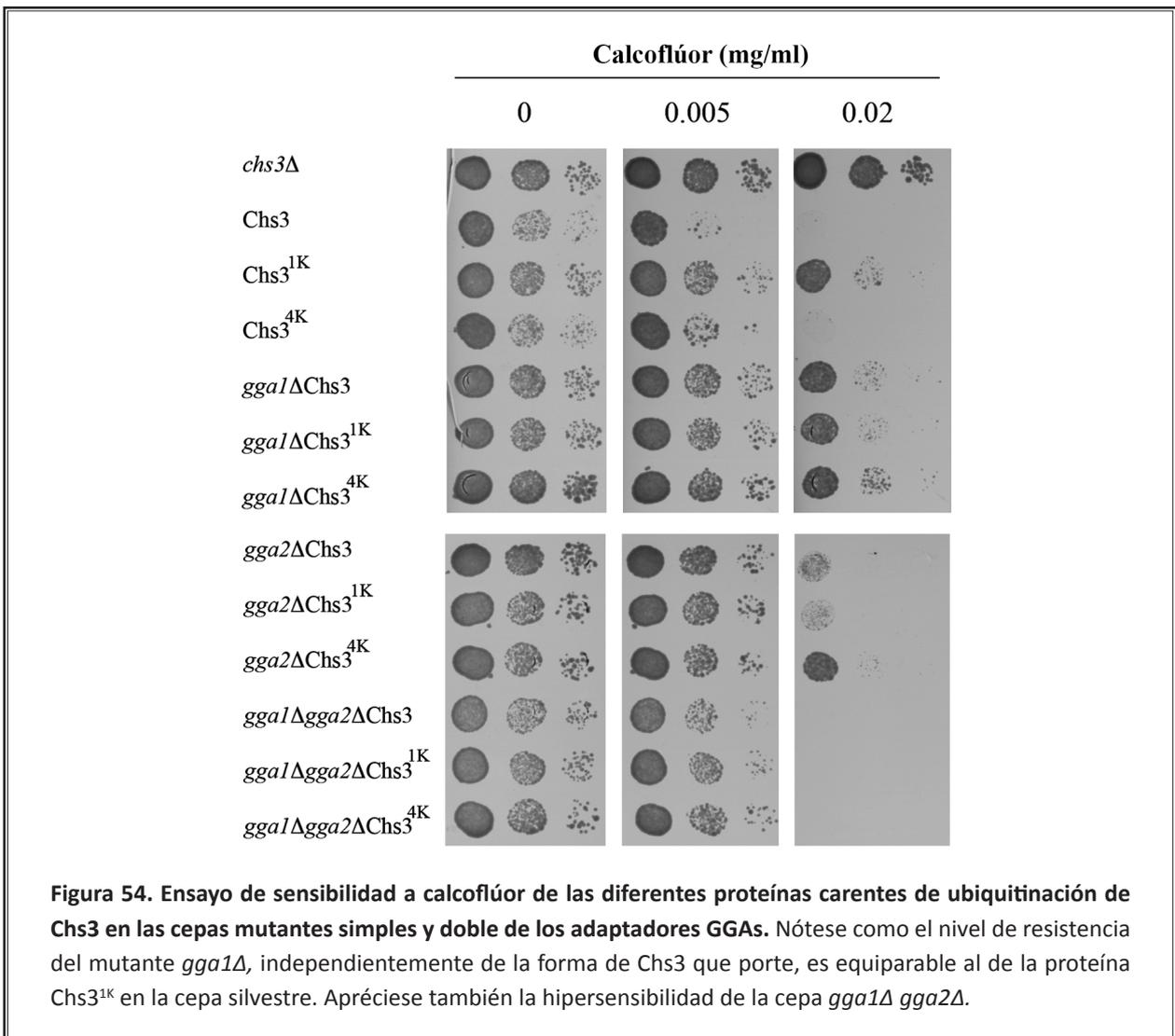


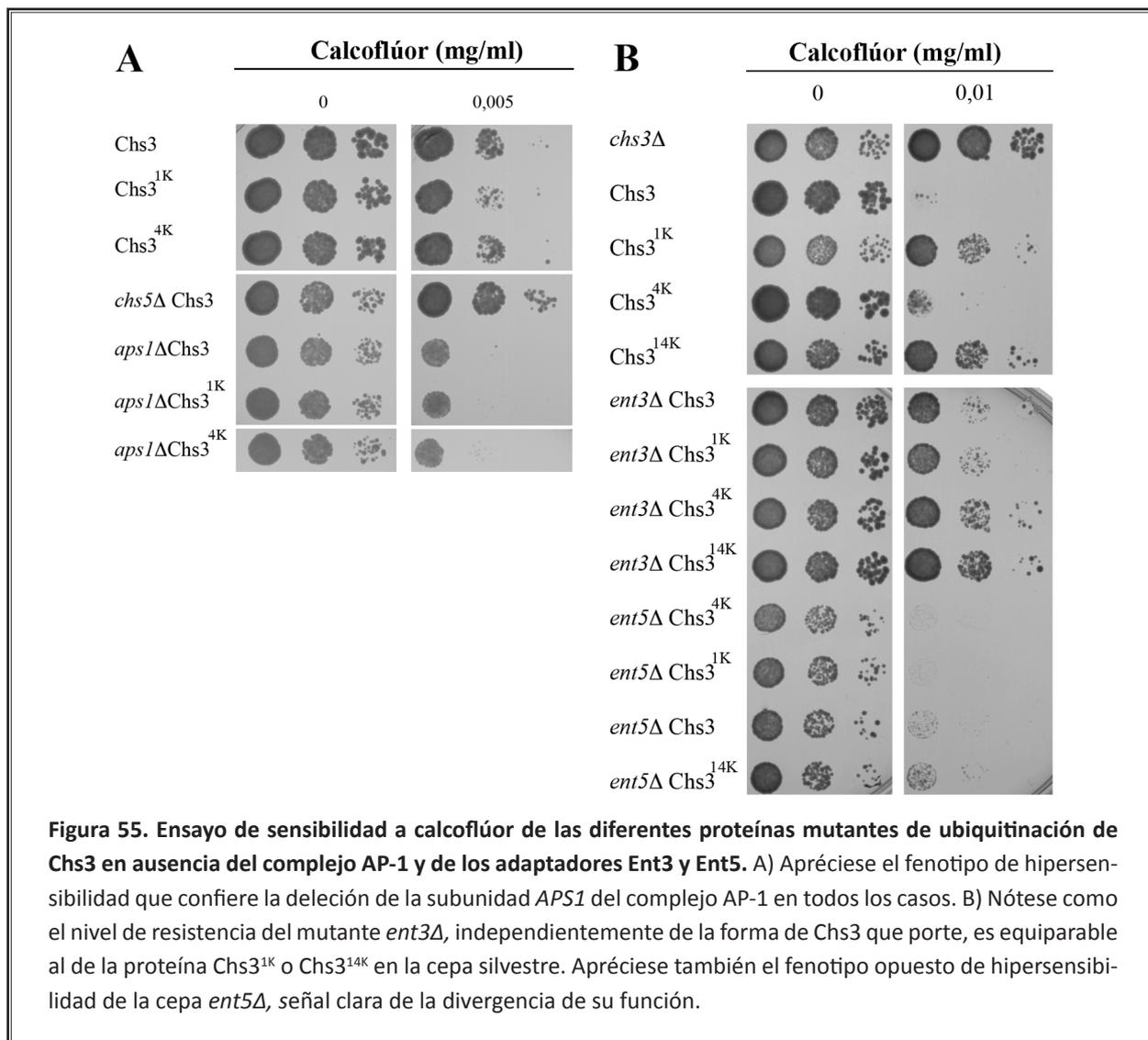
Figura 53. Análisis de colocalización de la proteína silvestre Chs3 y la mutante Chs3^{1K} con los diferentes adaptadores de clatrina. A) Proyección máxima de tres planos en Z mostrando la localización de las proteínas Chs3-GFP o Chs3^{1K}-GFP en una cepa co-expresando también Aps1mCherry. Similares imágenes de tomaron para los otros adaptadores. B) Análisis cuantitativo de los resultados de colocalización de las vesículas con las diferentes formas de Chs3 y aquellas con los adaptadores señalados. Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes. Se presenta también el análisis estadístico.

8.2. Análisis del fenotipo de sensibilidad o resistencia a calcoflúor de cepas mutantes de los adaptadores de clatrina.

Como la mutación de la lisina K1157 de Chs3 confería un fenotipo de resistencia a calcoflúor atribuible al bloqueo del tráfico de la proteína, investigamos este fenotipo en cepas mutantes, simples y dobles, de los diferentes adaptadores. Este análisis mostró que la delección de *GGA1* confería por sí misma unos niveles de resistencia similares a los de Chs3^{1K} en la cepa silvestre. Esta resistencia no era aditiva a la conferida por la proteína Chs3^{1K} (**Figura 54**). Este fenotipo no era compartido ni por *gga2Δ* ni por el mutante doble *gga1Δ gga2Δ*, que al contrario, presentó hipersensibilidad a calcoflúor (**Figura 54**) atribuible a la llegada de Chs3 a la MP a través de la ruta alternativa. Este resultado señalaba dos cosas: un posible bloqueo del tráfico de Chs3 en la cepa *gga1Δ* y un papel diferente para las proteínas Gga1 y Gga2 en el tráfico de Chs3, descritas hasta ahora como redundantes.



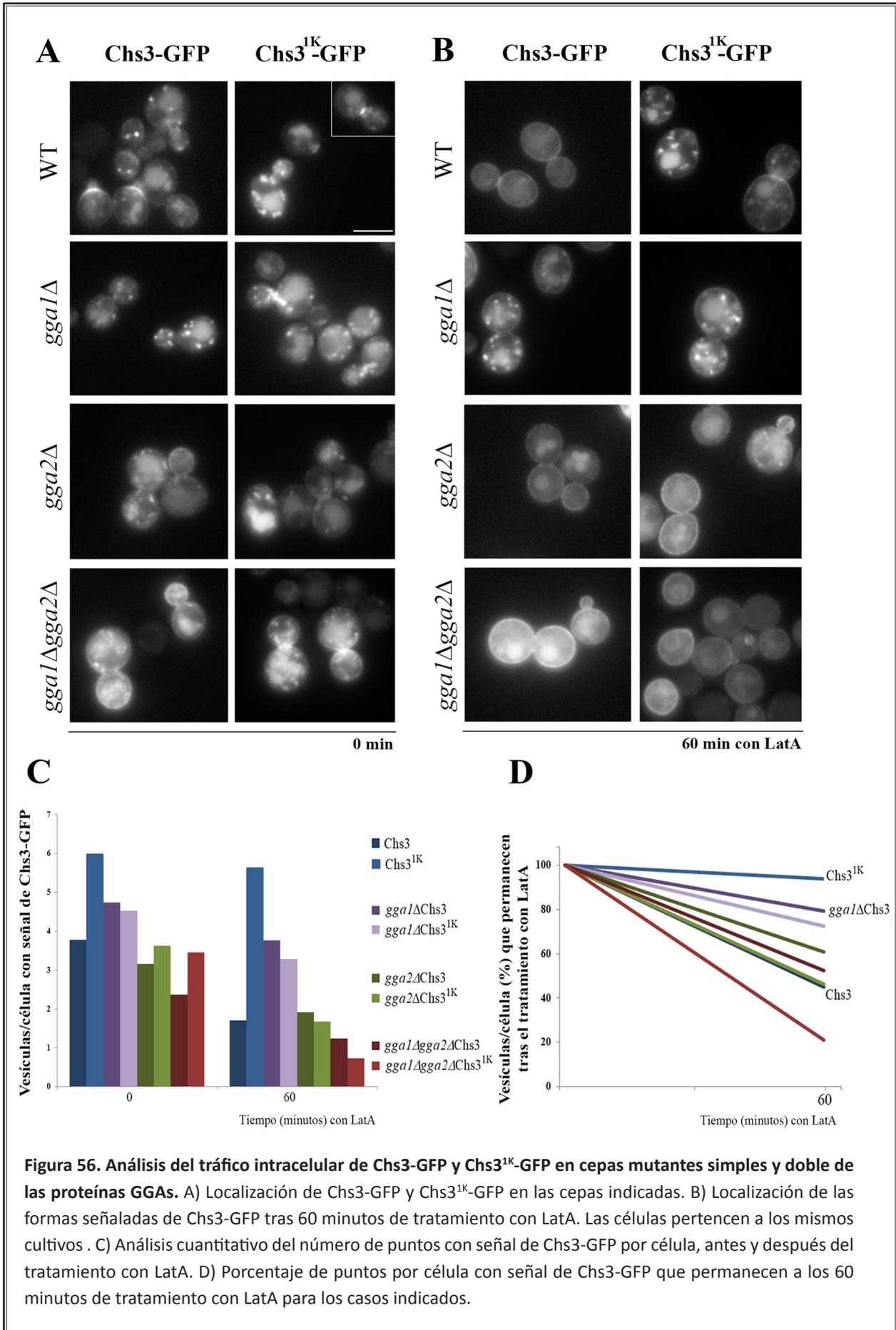
Realizamos este experimento para los otros adaptadores. La delección de la subunidad *APS1* del complejo AP-1 confería hipersensibilidad a calcoflúor, fenotipo ya descrito (Valdivia et al., 2002) y no se apreciaban diferencias significativas en el patrón de ninguna de las proteínas mutantes de Chs3 carentes de ubiquitina en comparación con la proteína silvestre (**Figura 55A**).



En el caso de los adaptadores de tipo epsina Ent3 y Ent5, fue la delección de *ENT3* la que confirió un patrón de resistencia a calcoflúor equiparable al de Chs3^{1K}, mientras que *ent5Δ* resultó hipersensible (**Figura 55B**) como también se ha determinado para la doble delección (Copic et al., 2007). La función de las epsinas se ha descrito como complementaria a la del resto de adaptadores. Así, Ent3 y Ent5 actuarían en paralelo con el complejo AP-1, mientras que Ent3 funcionaría además en el transporte dependiente de GGAs (Copic et al., 2007; Costaguta et al., 2006). Por ello decidimos enfocar nuestro estudio sobre los adaptadores GGAs.

8.3. Análisis de la función de los adaptadores GGAs en el tráfico de Chs3.

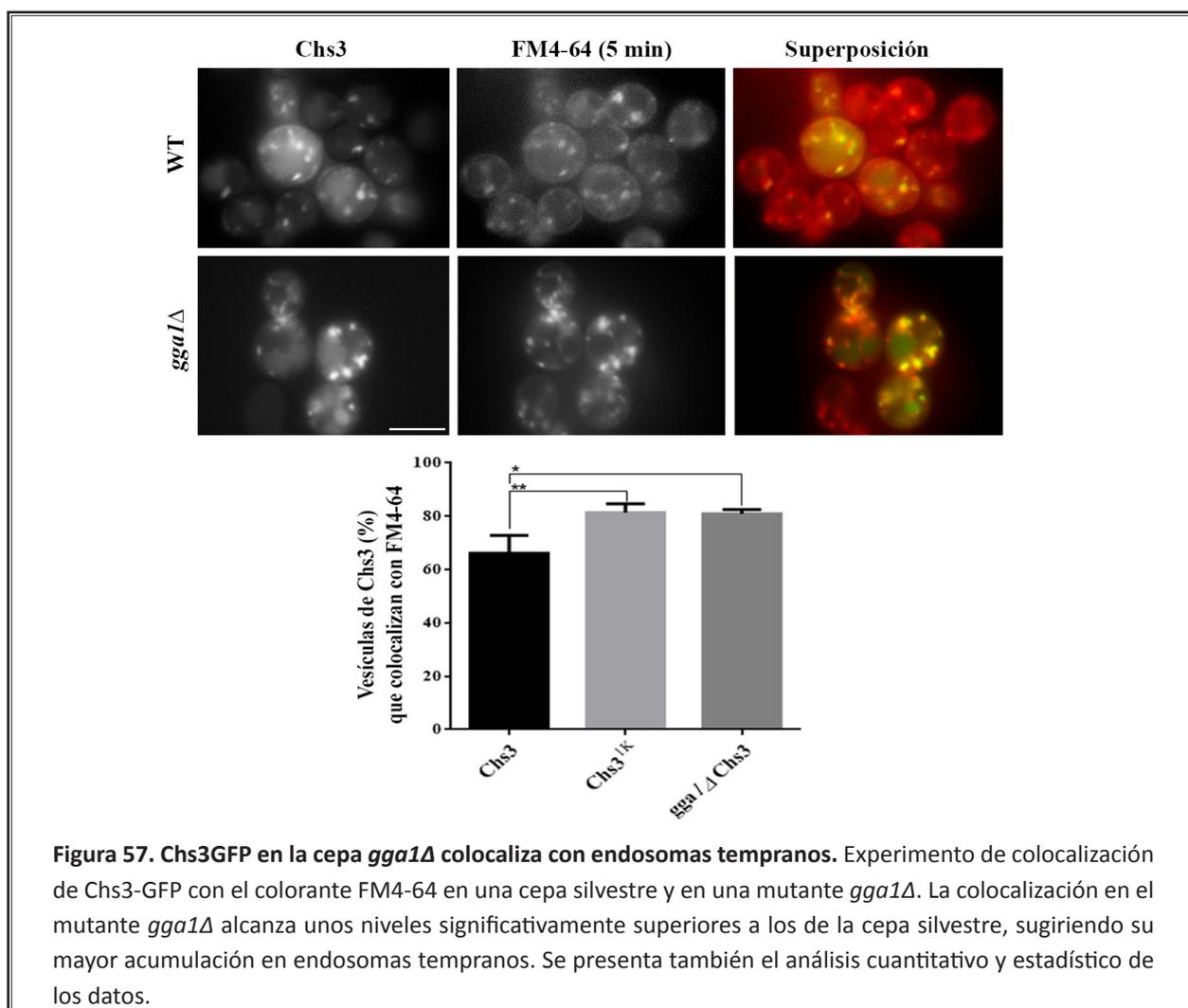
Estudiamos el tráfico de Chs3-GFP por microscopía de fluorescencia en las cepas mutantes simples y doble de las proteínas GGAs. En todos los casos Chs3-GFP se localizaba en el cuello y en vesículas intracelulares de manera similar a una cepa silvestre (**Figura 56A**). Sin embargo, había diferencias apreciables en todas ellas. En el mutante *gga1Δ*, Chs3-GFP aparecía en una mayor número de puntos por célula, llegando casi a los 5 ($4,73 \pm 0,665$ puntos/célula), de manera análoga a lo que ocurría con la proteína Chs3^{1K}-GFP (**Figura 56A y 56C**). Este fenotipo, sumado a la resistencia a calcoflúor, apuntaba de nuevo a una retención de



la proteína en TGN/endosomas tempranos. De manera opuesta, la delección de *GGA2* o la mutación doble *gga1Δ gga2Δ* relocalizaban parcialmente Chs3-GFP en la MP (**Figura 56A**), fenotipo que concuerda con la apertura del tráfico de Chs3 a la MP por la ruta alternativa (Copic et al., 2007). No se observaron diferencias significativas en la localización de la proteína Chs3^{1K}-GFP en comparación con la proteína silvestre en ninguna de estas cepas (**Figura 56A**).

El tratamiento con Latrunculina A durante 60 minutos confirmó la retención de Chs3-GFP en *gga1Δ*, manteniéndose el porcentaje de puntos tras el tratamiento en niveles similares a los de la proteína Chs3^{1K}-GFP (69.93% y 83.04%, respectivamente). Sin embargo, en el resto de casos la proteína era capaz de progresar en su tráfico y los puntos disminuían a niveles similares a los de Chs3-GFP en la cepa silvestre (**Figura 56B, 56C, 56D**).

Para comprobar que los puntos donde Chs3-GFP quedaba retenido en el mutante *gga1Δ* correspondían con TGN/endosomas tempranos, teñimos estas cepas con el colorante FM4-64 durante 5 minutos (**Figura 57**). Los niveles de colocalización de las vesículas con Chs3-GFP en la cepa *gga1Δ* con las marcadas por el FM4-64 volvían a ser significativamente mayores que los de una cepa silvestre (80.93%±0.88 frente al 66.15%±3.84 de la cepa silvestre), confirmando la retención de la proteína en TGN/endosomas tempranos.



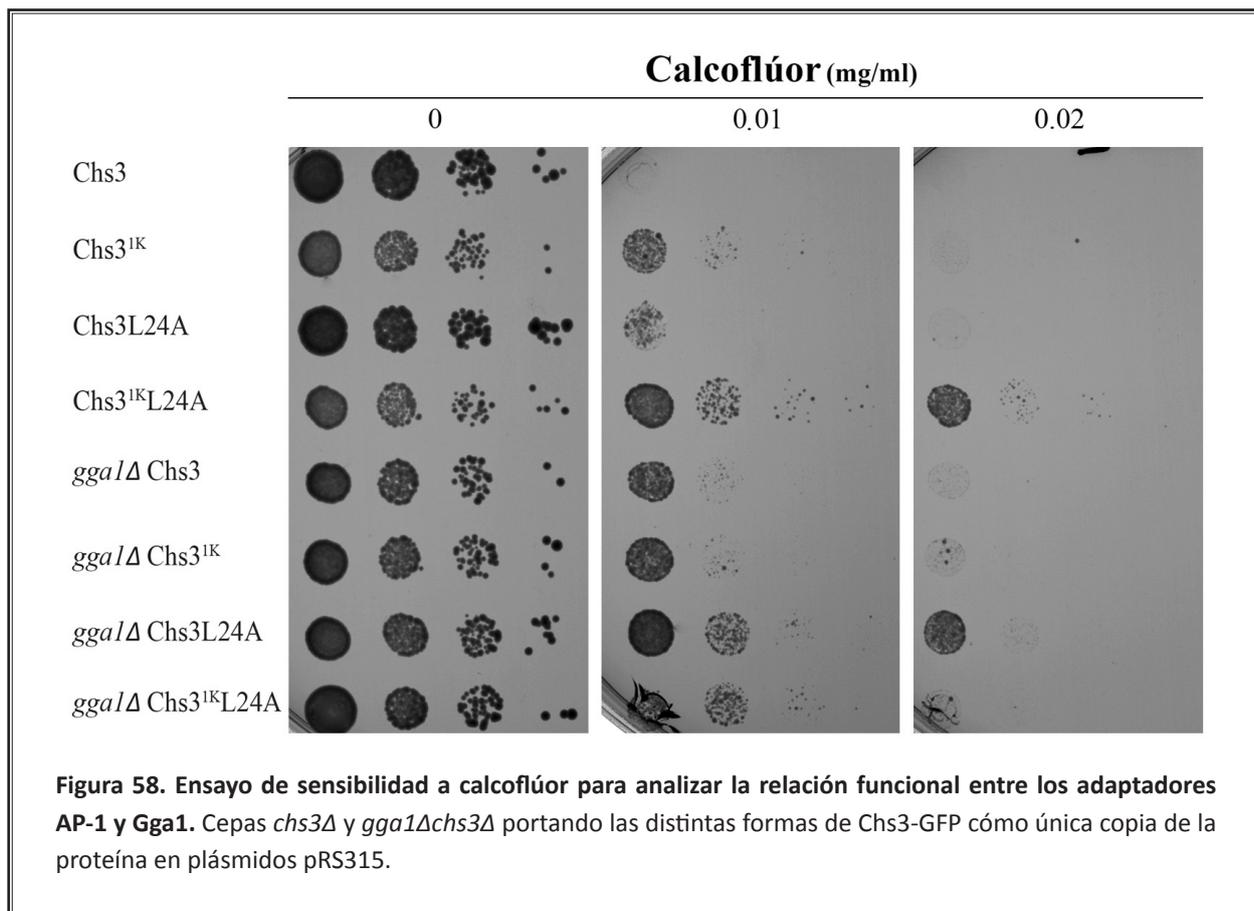
Este resultado señala a Gga1 como el adaptador de clatrina que media el tránsito de Chs3 de endosomas tempranos a TGN. El hecho de que los fenotipos de Chs3^{1K}-GFP en *gga1Δ* no se incrementen con respecto a los de la proteína silvestre para ninguno de los fenotipos testados (**Figura 56**) sugiere que actúan en la misma vía, y apunta que la ubiquitinación C-terminal de Chs3 puede estar mediando el reconocimiento por este adaptador. Este planteamiento no es descabellado ya que se ha descrito que el dominio GAT de las GGAs de levaduras tiene la capacidad de unir ubiquitina (Scott et al., 2004).

¿Cómo se interpreta entonces que en el mutante doble *gga1 Δgga2Δ* sea hipersensible a calcoflúor? La explicación que nosotros proponemos depende de la ruta alternativa que se abre en la cepa *gga1Δ gga2Δ* y que permite la llegada de Chs3 a la MP de forma independiente del exómero (Copic et al., 2007; Valdivia et al., 2002). Nosotros postulamos que la ausencia de la proteína Gga2 es la responsable de este fenotipo, ya que en una cepa *gga2Δ* ya se distingue una acumulación de Chs3-GFP en la MP. Lo que sucedería en el mutante doble es que al estar bloqueado el tráfico por la ausencia de Gga1 habría más proteína retenida en TGN/endosomas tempranos susceptible de ir por la ruta alternativa, abierta al faltar también Gga2. Esto además explica por qué el fenotipo del doble mutante es más evidente, pero contradice el papel redundante que se había establecido para estas dos proteínas, en el que Gga1 tendría una función minoritaria (Bonifacino, 2004; Scott et al., 2004). Lo que nosotros proponemos, sin embargo, es que estas dos proteínas lejos de ser redundantes, presentan funciones diferentes, actuando probablemente a niveles distintos dentro de la ruta endosomal.

8.4. Relación entre los complejos adaptadores AP-1, Gga1 y la ubiquitinación C-terminal de Chs3.

Quisimos abordar la relación del complejo adaptador AP-1, que como ya se ha descrito también participa en el tráfico de Chs3 de endosomas tempranos a TGN, con la ubiquitinación de la lisina K1157 de Chs3 y con el adaptador Gga1. Para ello recurrimos a la proteína Chs3^{L24A}-GFP, en la que se ha mutado un residuo responsable de la interacción con AP-1 (Starr et al., 2012), evitando así los efectos pleiotrópicos de la delección del complejo AP-1 en la célula. El análisis de la sensibilidad a calcoflúor mostró que el ligero fenotipo de resistencia de las proteínas Chs3^{1K} y Chs3^{L24A} (Sacristán, C. no publicado) se sumaba en el caso de Chs3^{1KL24A} (**Figura 58**). Este efecto sumatorio implica que el papel de la ubiquitinación C-terminal de Chs3 es independiente de la función que ejerce el complejo AP-1. De manera análoga, cuando introducimos la proteína Chs3^{L24A} en la cepa *gga1Δ* aumentan los niveles de resistencia, señalando también funciones independientes para los complejos AP-1 y Gga1. Por su parte, los niveles de resistencia de las cepas que portan Chs3 en un mutante *gga1Δ* son muy similares a los de Chs3^{1K} en una cepa silvestre, y no varían cuando la cepa *gga1Δ* porta la proteína mutante Chs3^{1K} (**Figura 58**). Esto es indicativo de que tanto Gga1 como la ubiquitinación de la lisina 1157 de Chs3 participan en el mismo evento, ya que sus fenotipos no son aditivos.

A la vista de estos resultados, parece que el reciclado de Chs3 de endosomas tempranos a TGN está mediado por los dos adaptadores de clatrina, AP-1 y Gga1, pero ejerciendo funciones independientes. Sin embargo, la relación entre la ubiquitinación de la lisina K1157 de Chs3 y el adaptador Gga1 resulta evidente, sugiriendo que esta ubiquitina puede ser la señal que media el reconocimiento de Chs3 por Gga1 necesario para que tenga lugar el tráfico por la ruta endosomal temprana.



8.5. Los adaptadores de clatrina Gga1 y Gga2 no son redundantes.

Las proteínas adaptadoras de clatrina Gga1 y Gga2 se describieron en 2001 por (Zhdankina et al., 2001) como efectores de las GTPasas ARF que participaban en el tráfico desde TGN. Concretamente observaron defectos en el procesamiento de la invertasa y en el tráfico de la Carboxipeptidasa Y (CPY) en el mutante *gga2Δ*, que eran más intensos en el doble mutante *gga1Δgga2Δ*. Posteriormente, también se vio que la delección combinada de ambos genes impedía el procesamiento proteolítico, además de la CPY, de otras hidrolasas vacuolares como la proteinasa A (PrA) y la carboxipeptidasa S (CPS). Como su procesamiento a formas activas tiene lugar en la vacuola, este fenotipo era indicativo de un defecto en el transporte hasta la vacuola, sin estar claro el paso exacto comprometido en ausencia de estas proteínas. Estudios con Pep12, una proteína tipo SNARE que actúa a nivel de endosomas tardíos, mostraron como en el doble mutante de las Ggas la proteína se deslocalizaba de Golgi a endosomas tempranos, sugiriendo un papel para estas proteínas en el transporte desde Golgi tardío a endosomas tardíos (Bonifacino, 2004).

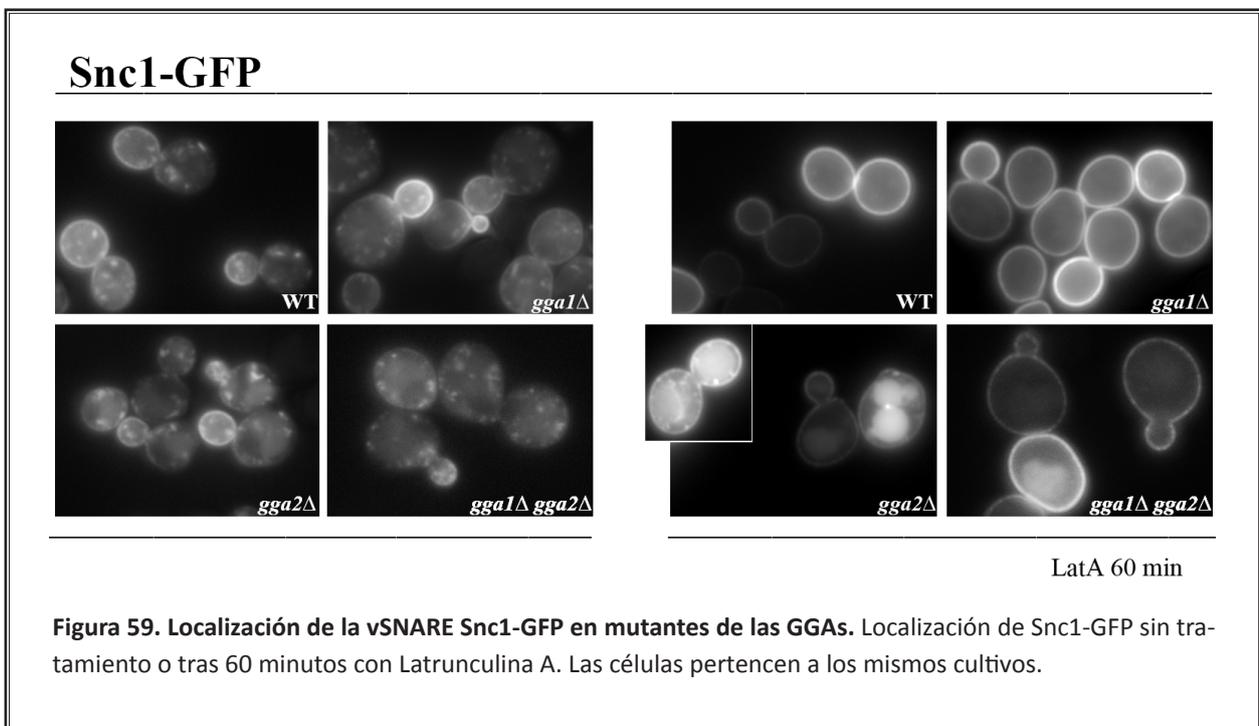
Igualmente se observó como la delección conjunta de ambos genes o sólo la de *GGA2* provocaba alteraciones en el tráfico de otras proteínas, modificando su clasificación en el TGN o relocalizando la proteína en la MP en condiciones en las que debería de llegar a la vacuola. Este fue el caso de las proteínas Gap1, Arn1 o Ste13 (Deng et al., 2009; Kim et al., 2007; Scott et al., 2004). Todos estos resultados han situado la función de las Ggas en el transporte entre TGN y endosomas tardíos, pero hasta la fecha se desconoce el papel que desempeñan. Así mismo, la ausencia de fenotipos de la cepa *gga1Δ* ha llevado a considerar

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

redundante la función de ambas proteínas, con una acción predominante de Gga2 sobre Gga1, motivo por el cual la mayor parte de los estudios se han llevado a cabo con la cepa *gga2Δ* o con el mutante doble.

Otra de las proteínas cuyo transporte se vio alterado en ausencia de las Ggas es la que nos ocupa a nosotros, Chs3. En su caso ya se ha descrito que la delección simple de *GGA2* o la delección combinada de *GGA1* y *GGA2* relocaliza Chs3 en la MP por la ruta alternativa (Copic et al., 2007). Sin embargo, nuestros resultados muestran que este fenotipo está asociado de la delección de *GGA2*, y dan por primera vez un fenotipo claro para la cepa *gga1Δ*, el bloqueo del reciclado de Chs3 en endosomas tempranos/TGN.

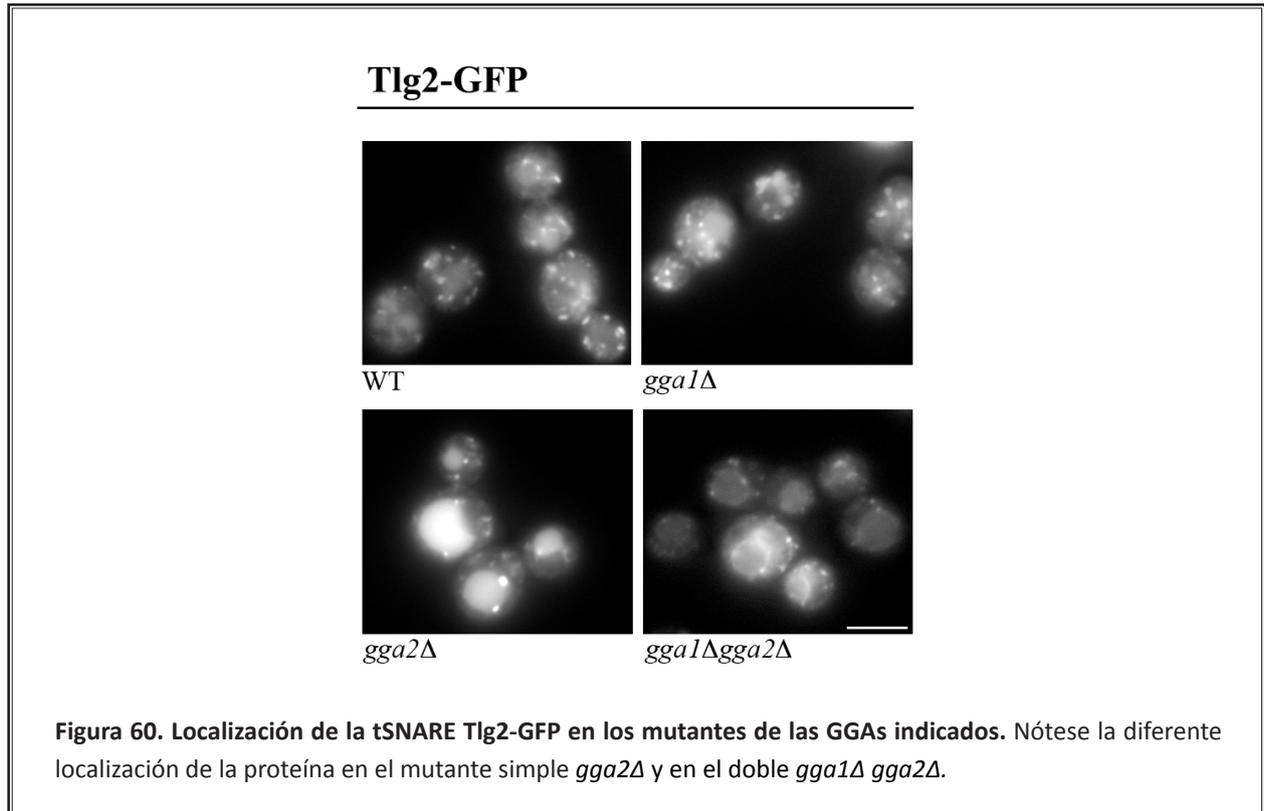
Para comprobar si la función de Gga1 era general, decidimos analizar en las cepas mutantes de las GGAs el comportamiento de otras proteínas: la v-SNARE Snc1, que se recicla por la ruta endosomal temprana de forma dependiente del complejo AP-1 (Chen et al., 2005), y las t-SNAREs Tlg1 y Tlg2, que actúan a nivel de Golgi tardío y están implicadas en la endocitosis y transporte de cargos desde endosomas a vacuola (Lewis et al., 2000). El tráfico de Snc1-GFP sólo se vio alterado en el mutante doble *gga1Δ gga2Δ*, en el que la proteína perdía su localización en la MP. Además, tras 60 minutos de tratamiento con Latrunculina A, y a diferencia de Chs3, la proteína no se quedaba retenida en TGN/endosomas tempranos en ningún caso, sino que en la delección de *GGA2* y más ligeramente en el mutante doble se iba a la vacuola (**Figura 59**). Aunque por el momento no podemos explicar estos resultados, sí sugieren que las Ggas desempeñan una función diferente en el tráfico de Snc1 que en el de Chs3, y de nuevo, que la función de Gga1 y Gga2 es diferente.



En el caso de las t-SNAREs, no se observó ningún fenotipo para Tlg1-GFP (datos no mostrados) cuyo tráfico parece independiente de las GGAs. Sin embargo, no ocurría lo mismo para Tlg2-GFP. En este caso la proteína pasaba de localizarse a nivel de Golgi y endosomas en la cepa silvestre y en el mutante simple *gga1Δ*, a situarse mayoritariamente en la vacuola y en el MVB en ausencia de Gga2. Sorprendentemente,

en el mutante doble *gga1Δ gga2Δ* este fenotipo no sólo no se acentuaba si no que era diferente, pasando Tlg2-GFP a ocupar la membrana de la vacuola (**Figura 60**). Esto sugería un papel para el adaptador Gga1 diferente e independiente de Gga2, pero sólo apreciable en ausencia de ambos.

Estos estudios todavía son preliminares pero todos estos casos apuntan claramente a una función diferente para estas dos proteínas, ignorada hasta el momento por la sutileza del fenotipo de la delección de *GGA1*. Así mismo, esta función parece depender de la proteína cargo, ya que los fenotipos que observamos difieren en cada caso.



DISCUSSION GENERAL

1. EL RECICLADO DE Chs3 ES MEDIADO POR DOS MECANISMOS INDEPENDIENTES: AP-1 Y RETRÓMERO.

El tráfico intracelular de Chs3 se ha caracterizado por la existencia de un mecanismo de reciclado muy eficaz a nivel de endosomas tempranos/TGN que da lugar a un reservorio intracelular de la proteína a este nivel, y que es dependiente del complejo adaptador de clatrina AP-1 (Valdivia et al., 2002; Ziman et al., 1996). Se ha propuesto que AP-1 favorece la retención de Chs3 en el TGN, y que sólo en su ausencia se abriría la denominada ruta alternativa, que permite la secreción no polarizada e independiente del exómero de Chs3 a la MP. Espacialmente, este tráfico de Chs3 se podría equiparar al transporte basolateral y apical que tiene lugar en células epiteliales. Así el transporte basolateral se correspondería con el tráfico polarizado de Chs3 dependiente de AP-1 y de su paso por TGN, y el transporte apical con la ruta alternativa de Chs3, que probablemente parta de endosomas tempranos siendo independiente de AP-1 (Bonifacino, 2014). Es muy posible que la acción de AP-1 en la polarización de Chs3 esté directamente ligada al acoplamiento funcional de éste con el exómero, una línea de trabajo en desarrollo en el laboratorio pero no abordada en esta memoria.

Sin embargo, nuestros resultados indican que a pesar de este eficiente reciclado, hay parte de Chs3 que circula normalmente por la ruta endosomal tardía. ¿Cuál es la función de este tráfico? Nuestros resultados sugieren más de una función. Una parte de la proteína Chs3 que llega al sistema endosomal tardío está señalizada para su degradación en la vacuola, dando lugar a la eliminación de la proteína potencialmente dañada (MacGurn et al., 2012). Sin embargo, el reciclado de Chs3 por el retrómero indica que la ruta endosomal tardía también contribuye al mantenimiento del reservorio intracelular de Chs3 a nivel de TGN. La cantidad precisa de Chs3 que se recicla por esta segunda vía es, hasta el momento, extremadamente difícil de calcular debido a la complejidad del tráfico intracelular de Chs3, sin embargo, la moderada resistencia a calcoflúor del mutante *vps35Δ* sugiere que el reciclado mediado por el retrómero, aunque probablemente minoritario, no es funcionalmente despreciable. De hecho, la resistencia a calcoflúor de las cepas que expresan ^{Δ63-125}Chs3, que no es reciclada por el retrómero, sugiere la misma idea.

Así, nuestros resultados reflejan que el reservorio intracelular de Chs3 en TGN/endosomas tempranos es consecuencia de dos mecanismos de reciclado independientes, uno mediado por el complejo AP-1 y extensamente descrito (Starr et al., 2012; Valdivia et al., 2002), y otro mediado por el retrómero, actuando este segundo como un mecanismo adicional para reciclar la proteína Chs3 que escapa al complejo AP-1. Así, el complejo AP-1 actuaría en primer lugar, reciclando Chs3 de los endosomas tempranos, mientras que el retrómero, en concordancia con su localización, reciclaría la proteína que llega hasta el MVB. Esto se evidencia en que en la cepa *vps27Δ vps35Δ*, Chs3 permanece en la membrana de la vacuola a pesar de la presencia del complejo AP-1. Esta proteína no estaría siendo internalizada en las ILVs por la ausencia de un ESCRT funcional ni reciclada por retrómero. Su permanencia en la membrana de la vacuola indicaría que tampoco puede ser reciclada por el complejo AP-1, presente pero incapaz de actuar sobre la proteína a este nivel. Nuestros resultados pues indican que el retrómero reciclaría toda la proteína Chs3 que llega a los endosomas tardíos y que no ha sido previamente internalizada en ILVs para su degradación.

Estos resultados son coincidentes con lo descrito para la proteína Ste13, a pesar de que esta proteína sólo contiene un dominio transmembrana y es residente en el Golgi no llegando nunca a la MP (Foote and

DISCUSIÓN GENERAL

Nothwehr, 2006; Nothwehr et al., 2000). Además, ambas, Chs3 (este trabajo) y Ste13 (Foote and Nothwehr, 2006; Nothwehr et al., 2000) dependen de diferentes secuencias N-terminales para su interacción con los complejos AP-1 y retrómero, en clara armonía con los distintos mecanismos de reclutamiento de cargo descritos para estos complejos (Bonifacino, 2014; Seaman, 2012).

La acción complementaria de dos mecanismos de reciclado todavía no se ha descrito para otras proteínas de membrana con múltiples dominios transmembrana, pero sería compatible con lo que se conoce del tráfico del transportador de aminoácidos Gap1 (O'Donnell et al., 2010; Rubio-Texeira and Kaiser, 2006), sugiriendo la posibilidad de que el reciclado complementario de AP-1 y retrómero sea un mecanismo mucho más general para el reciclado de proteínas de membrana plasmática.

Reconocimiento de Chs3 por el retrómero.

¿Cómo reconoce el retrómero sus cargos? El reconocimiento de cargos es una habilidad intrínseca del funcionamiento del retrómero, pero hasta la fecha continúa siendo un misterio. Generalmente se considera que este papel lo desempeña el trímero de reconocimiento de cargo, Vps35-Vps29-Vps26 (Seaman, 2012). Estudios genéticos en levadura apoyan un papel directo de la proteína Vps35 en la unión de los cargos, sin embargo, datos recientes en mamíferos han revelado también un papel para Vps26 en la unión directa de cargos (Mukadam and Seaman, 2015).

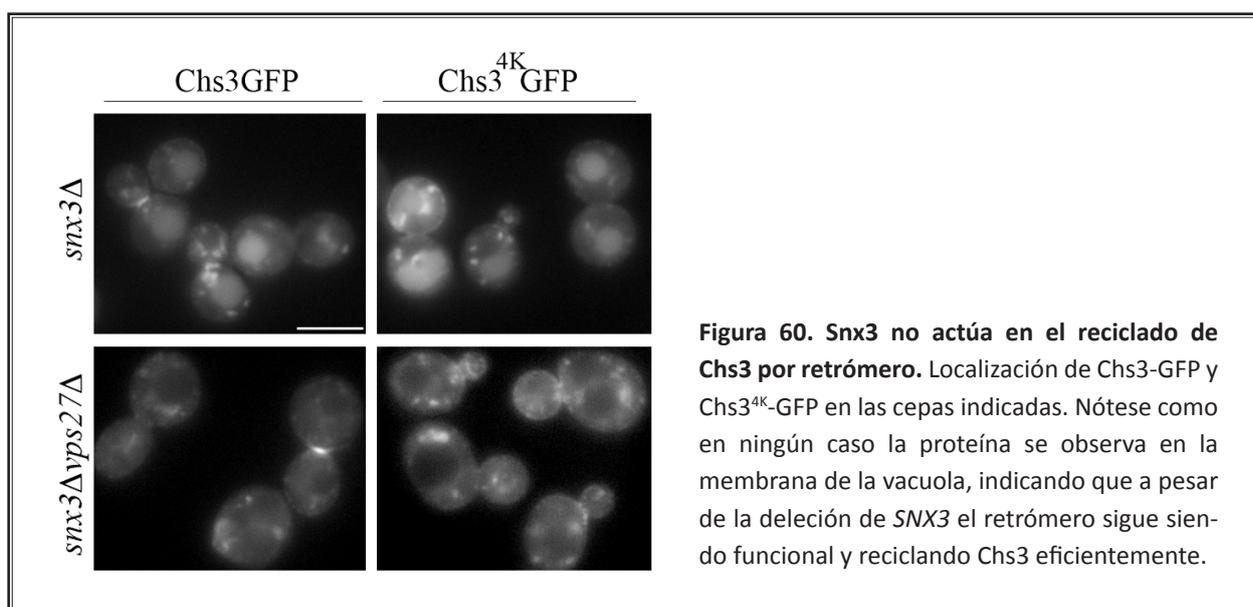
En células de mamífero la mayoría de los cargos identificados del retrómero interaccionan con Vps35 por un motivo conservado [FW]L[MV], aunque no todos se asocian a través de este dominio. Alternativamente, Vps26 contiene un dominio "arrestina" que también se ha propuesto que participa en el reconocimiento de cargos (McGough and Cullen, 2011). Otro factor que se ha visto implicado en la interacción cargo-retrómero es la palmitoilación reversible de residuos de cisteína presentes en la cola citoplasmática de ciertos cargos del retrómero, como la Sortilina. Se cree que su función es alterar la conformación del motivo reconocido por el retrómero regulando así la interacción. Sin embargo, no es un mecanismo universal, ya que hay cargos del retrómero que no poseen la cisteína en el dominio citosólico requerido (McGough and Cullen, 2011). Finalmente, en levaduras, un miembro de la familia SNX, Snx3, se ha demostrado que actúa como adaptador del retrómero mediando el tráfico retrógrado del transportador de hierro Fet3-Ftr1 (Strochlic et al., 2008); e incluso el dominio Snx-BAR se ha visto asociado directamente con algunos cargos.

Nuestros resultados nos han permitido demostrar que la proteína Chs3 interacciona con Vps35 a través de un dominio situado entre los aminoácidos 63 a 126. Sin embargo, no podemos discernir si esta unión es directa o mediada por otra subunidad, debido a la elevada complejidad técnica de expresar estas proteínas de alto peso molecular en un sistema como *E.coli*, para su posterior purificación y análisis de interacción. No hemos encontrado en Chs3 el dominio [FW]L[MV] conservado ni similar, por lo que tampoco podemos descartar que el reconocimiento se produzca a través del motivo arrestina de Vps26.

Chs3 es palmitoilada por la acil-transferasa Pfa4 en el RE, sin embargo la función descrita para esta modificación lipídica es asistir en el plegamiento y salida de Chs3 del RE, evitando su agregación en el mismo (Lam et al., 2006). Aun así, para confirmar si la palmitoilación tiene o no un papel en el reconocimiento por retrómero bastaría con estudiar la localización de la proteína no palmitoilada en una cepa *vps27Δ*. Lo

que si está claro en el caso de Chs3 es que la proteína Snx3 no participa en su reciclado como adaptador. Como se ve en la **Figura 60**, ni la proteína Chs3^{4K}-GFP en la delección de *SNX3*, ni la proteína silvestre en el mutante doble *vps27Δ snx3Δ* se localizan en la membrana de la vacuola, como sí ocurre cuando se deleciona *VPS35*, lo que indica que pese a la ausencia de Snx3 el retrómero sigue siendo funcional para el reciclado de Chs3.

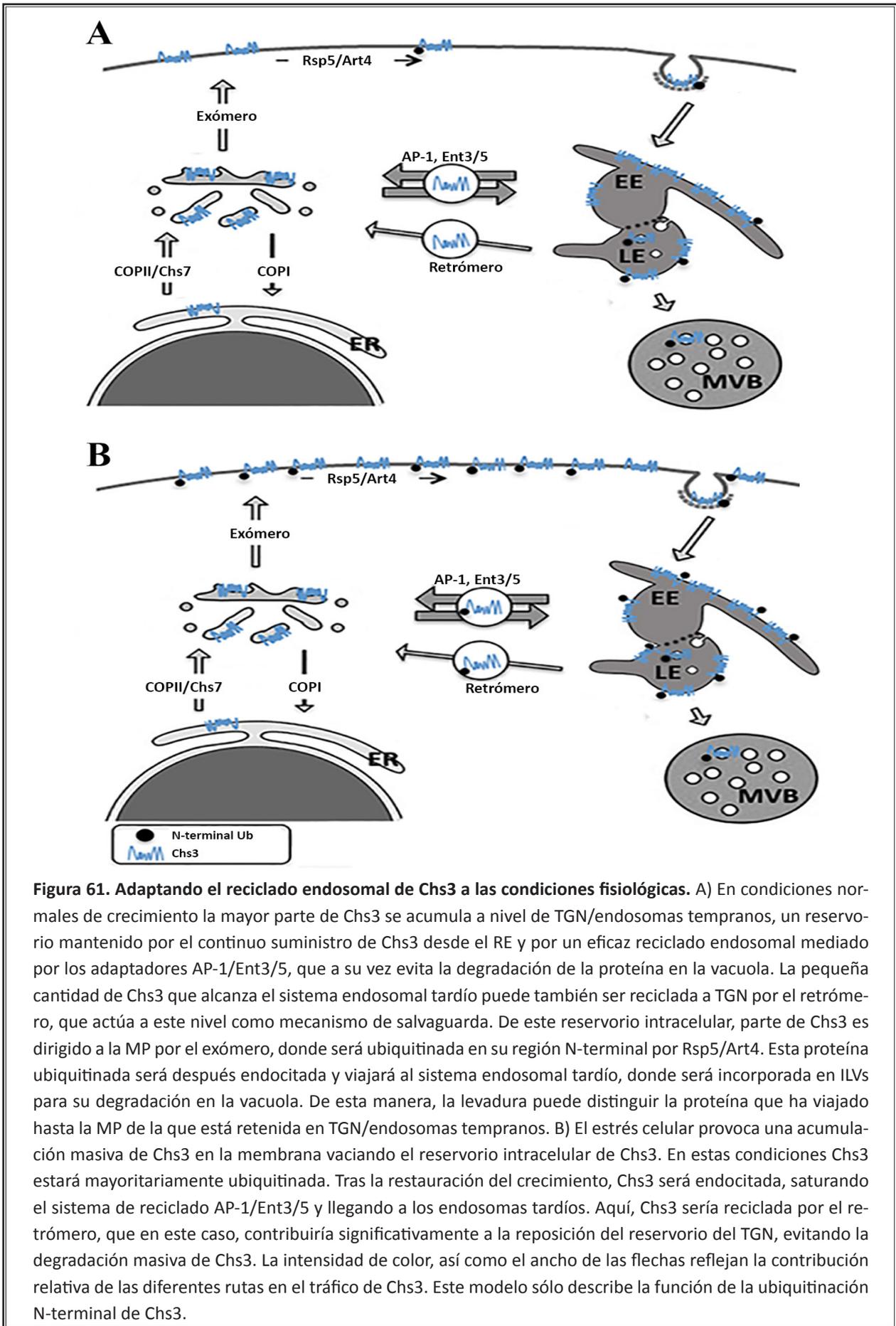
Estos resultados implicarían directamente el trímero de reconocimiento del retrómero como responsable de la interacción con Chs3, pero se requiere continuar el estudio para discernir el mecanismo concreto de esta interacción.



2. PAPEL BIOLÓGICO DEL TRÁFICO DE Chs3 POR LA RUTA ENDOSOMAL TARDÍA.

Nuestros resultados indican que a pesar de que Chs3 está extensamente ubiquitinada tras su paso por la membrana plasmática, su forma no ubiquitinada (Chs3^{14K}) parece que se endocita normalmente, sugiriendo que la ubiquitinación no es una señal esencial para la endocitosis de Chs3, al contrario de lo que ocurre para la mayoría de las proteínas de MP para las que la ubiquitinación es la señal necesaria y suficiente para su endocitosis (MacGurn et al., 2012); similares resultados han sido descritos, de nuevo, para la proteína Ste13 (Chen and Davis, 2002). Sin embargo, a día de hoy, no podemos excluir la presencia de residuos de ubiquitinación adicionales necesarios para su endocitosis pero que no hayan sido predichos bioinformáticamente, ni detectados en ensayos masivos.

Lo que sí se muestra claro a lo largo de este trabajo es que la ubiquitinación N-terminal de Chs3 regula su tráfico post-endocítico. Esta señal de ubiquitinación, adquirida en la MP, no parece intervenir en el reconocimiento de Chs3 ni por el retrómero ni por el complejo AP-1, ya que la proteína Chs3^{4K} ni se acumula en la membrana de la vacuola ni es capaz de alcanzar la MP por la ruta alternativa en el mutante *chs5Δ*. Sin embargo, esta ubiquitinación N-terminal sí participa en el reconocimiento por el complejo ESCRT, que como ya hemos definido reconoce y une sus cargos a través de dominios de unión a ubiquitina presentes en los subcomplejos ESCRT-0, -I y -II. Así, Chs3 se incorpora en las IVLs para ser posteriormente degradada en la vacuola, proceso que a su vez impide su reciclado por el retrómero.



Las señales de ubiquitinación para proteínas de MP ya se han descrito como una manera de eliminar las proteínas no deseadas por diferentes motivos, incluyendo cambios en el metabolismo celular (Becuwe and León 2014; Becuwe et al., 2012b) o conformaciones incorrectas (Zhao et al., 2013). Todavía no conocemos cuales son las razones que diferencian la proteína Chs3 que llega a la membrana plasmática, y sólo podemos especular con un potencial daño en la proteína tras la síntesis de la quitina. Las razones, sin embargo, han de ser biológicamente relevantes, ya que la célula ha desarrollado mecanismos para diferenciar la proteína que no llega a la MP, como en el caso del mutante *chs5Δ*, previniendo su ubiquitinación N-terminal y por tanto, su degradación en la vacuola. Además, como hemos demostrado, la introducción de un marcaje con ubiquitina exógeno en la región N-terminal de Chs3 es capaz de permitir su reconocimiento por el complejo ESCRT y su consiguiente degradación en la vacuola, incluso en ausencia del tráfico a través de la MP.

Una explicación alternativa, pero no necesariamente excluyente, es que el tráfico por la ruta endosomal tardía también contribuya a mantener estable el reservorio intracelular de Chs3, independientemente de la continua síntesis de proteína durante el crecimiento vegetativo. Esta posibilidad está en concordancia con los resultados en los que demostramos que las células no procesan para su degradación toda la Chs3 que se acumula en la MP después de un estrés térmico o tras la liberación del bloqueo endocítico, bien sea por saturación de la maquinaria de ubiquitinación en la MP, Rsp5/Rod1, o por saturación del complejo ESCRT (**Figura 61**). Si esto no fuera así, la depleción absoluta del reservorio intracelular de Chs3 ante el estrés, seguida de su degradación mediada por ubiquitinación comprometería la integridad celular durante la progresión del ciclo una vez que se restaura el crecimiento. De esta manera, la regulación de la degradación de Chs3 combinada con su reciclado desde la ruta endosomal tardía a través del retrómero, parece que contribuyen efectivamente al mantenimiento de los niveles intracelulares de Chs3, permitiendo a las células adaptarse a las condiciones externas a las que se enfrente.

3. DOS SEÑALES DE UBIQUITINACIÓN PARA REGULAR EL TRÁFICO POST-ENDOCÍTICO DE Chs3.

Como se puede inferir del presente trabajo y de todos los estudios previos, la proteína Chs3 presenta un intrincado tráfico intracelular regulado por el ciclo celular y dependiente de las condiciones ambientales. Esta regulación es a su vez la encargada de regular la síntesis de quitina mediada por la actividad QSIII, fundamental para el mantenimiento de la integridad celular en ambientes variables e impredecibles.

Pero, ¿cómo 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 (superior a las 3 horas) 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, nos lleva a pensar en un tipo de regulación eminentemente postraducciona. Este modelo, además, estaría de acuerdo con las múltiples modificaciones postraduccionales descritas para Chs3 en ensayos masivos, aunque hasta el momento se desconoce el papel de la mayoría.

Chs3 presenta diversas fosforilaciones, tanto en su extremo N-terminal como en la segunda región citosólica ((Albuquerque et al., 2008; Li et al., 2007; Smolka et al., 2007); nuestros resultados). Como parte

DISCUSIÓN GENERAL

del trabajo de esta tesis y de estudios pasados en el laboratorio, se han llevado a cabo mutaciones individuales y conjuntas en muchos de los sitios susceptibles de fosforilación, sin encontrar hasta el momento fenotipos evidentes, por lo que el papel de la fosforilación en Chs3 todavía queda por desvelar. También se abordó el estudio de la N-glicosilación de Chs3 (Cos et al., 1998) del primer lazo extracelular, cuya función de nuevo se desconoce por la carencia de fenotipos apreciables en los mutantes de las asparraginas correspondientes. En 2013 Sacristán et al., demostraron que Chs3 oligomeriza a través de su dominio N-terminal y que esta modificación es esencial para el correcto tránsito intracelular y secreción de la proteína. Además, es probable que Chs3 funcione en la MP en forma de oligómeros, al igual que ocurre para la celulosa sintasa.

Uno de los objetivos principales de este trabajo ha sido el análisis del papel de la ubiquitinación en la regulación de Chs3. Así determinamos, mediante análisis bioinformáticos, las 14 lisinas potencialmente ubiquitinables de Chs3, varias de las cuales además fueron confirmadas experimentalmente (Swaney et al., 2013). Y esta vez sí, se consiguió determinar el papel que tiene esta modificación en la regulación de Chs3, como se recoge en los resultados presentados en esta memoria.

Así, y como mencionábamos arriba, la extensa ubiquitinación de Chs3 no parece tener un papel en la endocitosis de la proteína, sino en la regulación de su tráfico post-endocítico. Lo que también resulta llamativo es que parece que este tráfico es regulado por dos señales directoras independientes, una en su extremo N-terminal y otra en el C-terminal, cuya acción se ve amplificada por la ubiquitinación conjunta de los residuos centrales. Así, la ubiquitinación N-terminal dirige el tráfico de la proteína por la ruta endosomal tardía que culminará con la degradación de la proteína en la vacuola. Esta ubiquitinación está mediada por Rsp5/Rod1 y requiere el paso previo por la MP. Nosotros postulamos que es en la MP donde tiene lugar esta ubiquitinación, ya que el tándem ART/Rsp5 actúa a este nivel, se produce una masiva ubiquitinación cuando la proteína queda retenida en la MP que además se evita si se bloquea la llegada a la misma (mutante *chs5Δ*).

Por su parte, la ubiquitinación de la lisina C-terminal 1157 de Chs3 parece estar implicada en el reciclado endosomal temprano de Chs3, ya que en su ausencia la proteína queda parcialmente retenida a nivel de TGN/endosomas tempranos. Nuestros resultados sugieren además que esta señal podría estar mediando la interacción de Chs3 con el adaptador Gga1. Los adaptadores GGA en levaduras poseen dominios de interacción con ubiquitina, y además los fenotipos de la delección de *GGA1* son equivalentes a los del mutante *Chs3^{1K}*, y nunca sumatorios, lo que implica su actuación al mismo nivel. Sin embargo, se requiere un análisis más profundo para poder confirmar esta relación. Hay muchos otros escenarios que aún no podemos descartar: puede que sea la ubiquitinación C-terminal la que marque el final de la interacción con el complejo AP-1 y que en su ausencia éste retenga a Chs3, lo que también explicaría la mayor colocalización de la proteína mutante con Aps1; o que la proteína no pueda interactuar con el exómero y por ello quede bloqueada en TGN/endosomas tempranos.

Lo que tampoco está claro a día de hoy es donde tiene lugar esta ubiquitinación ni quien es el adaptador responsable de mediarla. Nuestra hipótesis es que esta señal se adquiriría en los endosomas tempranos, tras la endocitosis de la proteína, ya que a este nivel tienen lugar muchas reacciones de ubiquitinación y desubiquitinación que determinan el destino de los cargos. Este modelo sería similar al propuesto

para Snc1, donde la ubiquitinación que dirige su reciclado a nivel de endosomas tempranos se produce en estos. Sin embargo, no tenemos evidencias que nos permitan descartar que esta señal provenga de la MP, y una vez en endosomas permanezca o sea retirada por las desubiquitinasas en función de a dónde deba dirigirse la proteína. En esta línea, en el laboratorio se está llevando a cabo el estudio del papel de distintas desubiquitinasas en el tráfico de Chs3.

En cuanto a la proteína responsable de mediar la interacción de Chs3 con la ubiquitina ligasa, la falta de evidencias robustas que ligen Rcy1 con ubiquitinación, así como el hecho de que no es adaptador de la E3 ligasa Rsp5, nos lleva a pensar en un adaptador diferente. Entre las proteínas adaptadoras que actúan a nivel de endosomas se incluyen las proteínas de membrana Bsd2, Tre1/2, Ear1, Ssh4, Rcr1/2 así como las proteínas solubles Bul1 y Bul2 (Nikko and Pelham, 2009). Tampoco se puede descartar el papel de Art4/Rod1 a este nivel como se ha citado anteriormente. Esto deja las puertas abiertas a la realización de un nuevo screening que nos ayude a elucidar la maquinaria responsable de la ubiquitinación C-terminal de Chs3.

4. ¿POR QUÉ UN TRÁFICO TAN COMPLEJO PARA UNA PROTEÍNA NO ESENCIAL?

Un punto crítico en la biología de la levadura es el mantenimiento de la integridad celular en ambientes variables e impredecibles, que se garantiza gracias al continuo remodelado de la pared celular, estructura indispensable que rodea la célula fúngica (Levin, 2011). Como ya hemos mencionado, la quitina es un componente esencial de la pared celular, que actúa como andamiaje para el ensamblaje del resto de los componentes (Cabib and Arroyo, 2013), siendo también fundamental frente al daño en la PC y al estrés, circunstancias en las cuales aumenta sus niveles para dar respuesta.

En levaduras, pero también en otros hongos, la mayor actividad quitín sintasa es la Quitín Sintasa III, siendo Chs3 su subunidad catalítica (Roncero, 2002). La QSIII es la responsable de la síntesis del anillo de quitina formado en el cuello durante la división celular 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; sin embargo, muestra un inusualmente amplio espectro de letalidad sintética, demostrando que la falta de la QSIII compromete la viabilidad celular en múltiples circunstancias (Lesage et al., 2005). Esta evidencia está de acuerdo con el aumento de la síntesis de quitina mediada por la QSIII tras diversas formas de estrés, resaltando la importancia de esta actividad en el mantenimiento de la integridad celular (Levin, 2011). Hay que tener en cuenta, que las cepas con las que se trabaja en el laboratorio están “domesticadas” y se mantienen en condiciones muy diferentes a las que pueda encontrar *S.cerevisiae* en su ambiente natural, mucho más diverso y cambiante, en cuyo caso la pérdida de Chs3 probablemente si fuera letal, como sugiere su persistencia evolutiva en todos los hongos a excepción de *S.pombe*.

En este escenario, no parece extraña la regulación de la actividad QSIII. Dada la naturaleza politópica de Chs3 y la necesidad de regular la actividad QSIII muy rápidamente, es probable que la célula optara evolutivamente por la regulación postranscricional de Chs3 y así ésta se basa en una compleja maquinaria accesoria que escolta a Chs3 a lo largo de la ruta de secreción y endocitosis, y una serie de señales que dirigen su destino. Su salida del RE requiere la interacción con Chs7 y su palmitoilación por Pfa4. La expor-

DISCUSIÓN GENERAL

tación del TGN es dependiente del exómero, una maquinaria molecular reservada a cargos muy específicos. Su activación y localización en la MP depende de Chs4, proteína también esencial en la regulación de su posterior endocitosis. Una vez que Chs3 ha sido endocitada, y en función de su ubiquitinación, la proteína puede ser reciclada desde los endosomas tempranos al TGN en vesículas de clatrina, en un proceso mediado por los adaptadores AP-1 y GGAs, o circular por la ruta endosomal tardía. En este segundo caso, la proteína puede estar marcada para su reconocimiento por el complejo ESCRT y su subsecuente degradación; o en caso contrario, ser reciclada de vuelta al TGN por una segunda maquinaria, el retrómero. Este doble sistema de reciclado de nuevo pone de manifiesto la importancia de mantener el reservorio intracelular de Chs3 estable, que permita una rápida respuesta frente a situaciones de estrés, así como la necesidad de gestionar su recuperación tras dicha respuesta, reciclando la proteína útil y descartando la que está dañada.

Ninguno de los mecanismos aquí descritos es nuevo, pero lo que sí lo es, es la convergencia de todos ellos en la regulación del tráfico de una única proteína. Parecería como si el tráfico de Chs3 recapitulara todos y cada uno de los mecanismos moleculares que la célula eucariota emplea en el control del tráfico intracelular de proteínas, sirviendo por tanto esta proteína como modelo de estudio para entender estos procesos.

CONCLUSIONES

1. Chs3 circula regularmente por la ruta endosomal tardía, siendo incluida en vesículas intraluminales por el complejo ESCRT para su posterior degradación en la vacuola.
2. Chs3 puede ser reciclada de endosomas tardíos por el retrómero, con el que interacciona por una región situada entre los aminoácidos 63 a 125 de su extremo N-terminal, que se presenta como una auténtica plataforma para el reconocimiento por proteínas adaptadoras. Este reciclado en endosomas tardíos complementa al mediado por AP-1 en endosomas tempranos.
3. Chs3 es ubiquitinada en la membrana plasmática en su extremo N-terminal por la acción conjunta de la E3 ubiquitin ligasa Rsp5 y al adaptador Art4/Rod1. Esta señal dirige la proteína a su degradación en la vacuola, al mediar su reconocimiento por el complejo ESCRT.
4. La ubiquitinación de la lisina C-terminal (1157) de Chs3 dirige su tráfico por la ruta endosomal temprana, en una función relacionada con el adaptador de clatrina Gga1.
5. El tráfico de Chs3 permite diferenciar la función de Gga1 y Gga2, demostrando papeles diferentes, en contraposición a lo que se creía hasta el momento.
6. La precisa regulación del tráfico de Chs3, mediada tanto por la maquinaria accesoria de proteínas adaptadoras como por las señales de ubiquitinación, permiten mantener la homeostasis de Chs3 incluso tras la respuesta a estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Para la realización de este trabajo se ha empleado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. La mayor parte de las cepas utilizadas derivan de la colección de deleciones simples de EUROSCARF construidas en el fondo BY4741/2, con la excepción de la cepa *rsp5-1^{ts}*, que pertenece a la colección de mutantes termosensibles de C. Boone (Li et al., 2011). Cuando fue necesario, se llevaron a cabo deleciones de genes adicionales empleando la técnica de reemplazamiento génico con diferentes casetes de deleción basadas en la resistencia a nourseotricina o higromicina, *natMX4* o *hphMX4* (Goldstein and McCusker, 1999). También se marcaron proteínas cromosómicamente en su extremo C-terminal con los epítopos 3xHA o 1xGFP, empleando casetes integrativas amplificadas de los plásmidos pFA6a-3HA-hphMx6 o pFA6a-GFP-hphMx6 respectivamente (Sato et al., 2005). La caracterización de la función o localización de Chs3 siempre se llevó a cabo en la cepa *chs3Δ::natMX4* conteniendo una única copia de la forma de *CHS3* deseada expresada en un plásmido centromérico bajo el control de su propio promotor. De forma rutinaria, estas cepas también portan el plásmido pRS423::*CHS7* para disminuir la retención de Chs3 en el RE.

Para obtener y manejar estas cepas se emplearon métodos generales previamente descritos (Rose et al., 1990). Las levaduras se transformaron por el procedimiento estándar acetato de litio/polietilenglicol. En la **Tabla 2** del Apéndice se recogen las cepas utilizadas así como su procedencia y características genéticas.

Para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizaron también diferentes estirpes de *Escherichia coli* (**Tabla 3**).

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

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

El medio empleado para el cultivo de *E. coli* fue LB (Luria-Bertani medium), compuesto por bacto-triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%, a pH7. Este medio se suplementó con ampicilina (50µg/ml) para seleccionar los clones portadores del gen de resistencia. Para preparar los medios sólidos se añadió agar al 2% a los medios antes descritos.

El crecimiento de *E. coli* se realizó a 37°C tanto en placa como en medio líquido. Las diferentes cepas se conservaron a -80°C en glicerol al 50%.

2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

Los medios empleados para el crecimiento de *S. cerevisiae* fueron YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa) y Medio Sintético Definido o SD (0.7% base nitrogenada sin aminoácidos, 2% glucosa). Este último se suplementa con una mezcla de 20 aminoácidos proteinogénicos y otros nutrientes, y con el fin de mantener la presión selectiva durante el crecimiento se las cepas transformadas con plásmidos, se elimina del medio el suplemento correspondiente. Los medios se solidificaron añadiendo agar al 2%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para los ensayos de inducción con glicerol, las células se incubaron en medio SD empleando glucosa como fuente de carbono. En fase logarítmica se recogieron y resuspendieron en el mismo volumen de SD-glicerol, en el que crecieron durante 3 horas.

El crecimiento vegetativo de esta levadura se llevó a cabo en placas o matraces a 28°C y con una agitación de 250rpm en el caso de los cultivos líquidos, con la excepción de la cepa mutante *rsp5-1^{ts}*, que se creció a la temperatura permisiva de 25°C. Los experimentos de estrés se llevaron a cabo cambiando las células de 25°C a 37°C.

El crecimiento se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600nm en un espectrofotómetro. El número de células por mililitro se estimó por comparación con una recta patrón, obtenida representando el número de células contadas en la cámara Thoma frente a la absorbancia a 600 nm (DO_{600} 1 aprox. $1-2 \times 10^7$ células/ml). A menos que se indique lo contrario todos los cultivos se recogieron en fase logarítmica temprana ($<DO_{600} 2$).

El mantenimiento de las cepas se realizó por siembras en placas de medio sólido, que se conservaron a 4°C entre 30 y 40 días. Las cepas se conservaron a -80°C en glicerol al 15%.

2.3. Medios suplementados con drogas.

El ensayo de resistencia a **calcoflúor white** (*Sigma*) se realizó en placas de YEPD o SD suplementadas con este antifúngico a la concentración final indicada. En el caso del medio SD fue necesario tamponar el medio con Biftalato potásico 50mM pH 6.2 para evitar la precipitación del calcoflúor. La resistencia en placa se realizó mediante ensayo de gota. Las células incubadas en el medio YEPD o SD correspondiente, se recogieron en fase logarítmica y se ajustaron en un mililitro de agua a DO_{600} 1. Se hicieron diluciones 1/10 sucesivas y con un replicador estéril se depositaron las gotas sobre las placas suplementadas con calcoflúor (Trilla et al., 1999).

Cuando fue necesario, se bloqueó la endocitosis empleando la droga despolimerizante de actina **Latrunculina A** (Enzo®) disuelta en DMSO (dimetilsulfóxido), a una concentración final de 0.03mM (Reyes et al., 2007) durante al menos 20 minutos.

3. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. Obtención de ADN.

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se llevó a cabo empleando el método de la lisis alcalina (Zhou et al., 1990). Cuando se requería ADN de mayor pureza o más concentrado, se utilizó el "kit" *QIAprep®Spin Miniprep kit* (*Qiagen*).

3.2. Tratamientos enzimáticos del ADN.

Todos los protocolos usados para manipular el ADN se recogen en las publicaciones de (Sambrook et al., 1989).

Los principales tratamiento enzimáticos realizados fueron: 1) Digestiones con endonucleasas de restricción. 2) Ligación mediante la ADN ligasa del fago T4. 3) Fosforilación del extremo 3' de oligonucleótidos con la polinucleótido quinasa del fago T4. 4) Creación de extremos romos utilizando el fragmento *Klenow* de la ADN polimerasa I de *E.coli*.

3.3. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o amplificación por PRC se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (*Agarosa D-1, Pronadisa*) preparados a una concentración variable entre 0.8% y 1.5% según el tamaño esperado de los fragmentos. Los geles se prepararon con tampón 1x TAE (Tris-acético 40mM, EDTA 2mM, pH7.5-7.8) y se añadió el agente intercalante *Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH)*.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema *NucleoSpin® Gel and PRC Clean-up (Macherey Nagel)*.

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

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PRC se llevó a cabo en un termociclador *T100TM Thermal Cyclor de BioRad*.

Dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores empleados y del tamaño del producto esperado, se realizaron modificaciones sobre el protocolo estándar de reacción:

Desnaturalización inicial	5 min. a 94°C	
1) Desnaturalización del ADN	30 sec. a 94°C	} 30 ciclos
2) Anillamiento	45 sec. a 55°C	
3) Extensión	3,5 min. a 68°C	
Extensión final	10 min. a 68°C	

Las mezclas de reacción contenían: ADN molde en cantidad variable según fuese ADN plasmídico o genómico, una mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) a una concentración final de 10mM, los dos oligonucleótidos cebadores (1 μ M cada uno), MgCl₂ 1.5mM. Las polimerasas empleadas incluyen *RedAccuTaq® (Sigma)* y *BioTAQTM (Bioline)* a 0.25 unidades/reacción y el tampón suministrado con la enzima. Los cebadores empleados en este trabajo se describen en la **Tabla 4**.

En las reacciones de amplificación se utilizaron temperaturas de anillamiento de entre 3 y 5 grados por debajo de la del cebador que tuviese la T_m más baja.

3.5. Secuenciación de ácidos nucleicos.

La técnica empleada se basa en la descrita por (Sanger, 1977), pero en este caso se emplearon dideoxi-nucleótidos marcados con fluorocromos y una láser capaz de reconocer cada uno de ellos. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca. Las secuencias se importaron mediante el programa *Chromas* (*Tehnelysium Pty Ltd*), que muestra el cromatograma de la reacción y la secuencia de ADN correspondiente.

3.6. Vectores de *S.cerevisiae* empleados.

Los vectores de *S.cerevisiae* empleados en este trabajo pertenecen a la serie pRS310: pRS313, pRS314, pRS315 y pRS316 (Sikorski, 1989), que poseen un marcador seleccionable: *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* y *URA3*, respectivamente. Cada uno de los plásmidos de esta serie contiene una secuencia de replicación autónoma *ARSH4* y una secuencia centromérica *CEN6*, lo que les confiere la capacidad de replicación autónoma y estabilidad mitótica y meiótica en bajo número de copias (1-2 por célula).

Los plásmidos de la serie pRS420 (Christianson et al., 1992), comparten la misma secuencia que los pRS310 pero además contienen un origen de replicación del plásmido 2μ de *E.coli* por lo que se mantienen en alto número de copias (20-30 por célula). Los plásmidos de esta última serie se han utilizado para los experimentos de sobreexpresión.

3.7. Construcción de plásmidos.

Las proteínas mutantes $\text{Chs3}^{\text{K1157R}}$ (Chs3^{1K}) y $\text{Chs3}^{\text{K118/119/123/136R}}$ (Chs3^{4K}) se generaron por mutagénesis dirigida, como se describe en (Trilla et al., 1999), usando como molde el plásmido pRS315::*CHS3-GFP*. La proteína mutante $\text{Chs3}^{\text{K118/119/123/136/1157R}}$ (Chs3^{5K}) se generó a partir de las construcciones Chs3^{1K} y Chs3^{4K} empleando los sitios de restricción Sall/HindIII. Finalmente, el mutante $\text{Chs3}^{\text{K118/119/123/136/1125/1126/1157R}}$ (Chs3^{7K}) se generó, de nuevo, por mutagénesis dirigida, usando esta vez el plásmido pRS315::*Chs3*^{5K}-*GFP* como molde.

Para obtener las proteínas mutantes $\text{Chs3}^{\text{K492/511/586/592/612/702/723R}}$ ($\text{Chs3}^{\text{K492-723R}}$) y $\text{Chs3}^{\text{K118/119/123/136/492/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R}}$ (Chs3^{14K}), se generó un fragmento sintético de Chs3 portando las mutaciones K492/511/586/592/612/702/723R (*Invitrogen*TM) que se transformó en *S.cerevisiae* junto con los plásmidos pRS315::*Chs3-GFP* o pRS315::*Chs3*^{7K}-*GFP* linearizados con la enzima PacI. Los plásmidos generados por recombinación homóloga se recuperaron en *E.coli* y se secuenciaron para confirmar la presencia de las construcciones esperadas $\text{Chs3}^{\text{K492-723R}}$ y Chs3^{14K} respectivamente.

La introducción de una ubiquitina en el extremo N-terminal de Chs3 se llevó a cabo como se describe a continuación. Primero se creó el plásmido pRS314::*CHS3* conteniendo un único sitio NcoI en el primer codón de *CHS3*. Este plásmido se linearizó con la enzima NcoI y se contrasformó en levaduras con

una casete conteniendo una única ubiquitina amplificada por PCR del gen *UBI4*, empleando cebadores híbridos (Chs3-UbiF: GTCCCATTTTCTTCAAAGGTCTGTTTAGACTATCCGCAGGAAAGatgcagatttctgtaagac y Chs3-UbiR: TTAAGGTTTCAGATAGTAGTCATCAGGATCATCTCCATTCAAGCCGGTCATaccacctcttagccttagca) que contenía las regiones flanqueantes adecuadas de *CHS3* para dirigir la recombinación homóloga. Después, el plásmido pRS315::^{UB}Chs3-GFP se obtuvo por subclonación convencional empleando los sitios de restricción *SacI*/*HindIII*.

Las truncaciones N- y C-terminales de Chs3 con sus correspondientes “tags” han sido descritas previamente (Sacristan et al., 2013). La mutación L24A de Chs3 (Starr et al., 2012) se llevó a cabo por mutagénesis dirigida sobre los plásmidos correspondientes. Para generar el plásmido pRS315::*Chs3-HBH*, amplificamos por PCR la casete HBH de la cepa YPH499 *CHS3::HBH* cedida por la Doctora Anne Spang y procedimos como está descrito en (Tagwerker et al., 2006). El casete posteriormente se clonó en el extremo C-terminal de pRS315::*Chs3* empleando los sitios de restricción *HindIII*/*SphI*.

Para analizar el grado de ubiquitinación de Chs3, se empleó el plásmido YEplac195 para la expresión de His₇-ubiquitina bajo el control del promotor *CUP1*. El plásmido vacío sirvió como control (Parker et al., 2007).

Todas las construcciones se confirmaron mediante secuenciación. Para una lista completa y detallada de todos los plásmidos empleados en este trabajo ver **Tabla 5**.

4. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIONES.

4.1. Microscopía de fluorescencia.

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

En algunas ocasiones también se empleó el equipo Personal DeltaVision Microscope (*Applied Precision*) equipado con un microscopio invertido *Olympus IX-71*, una lámpara de xénon de 300W y una cámara *Photometrics CoolSNAP HQ-2 Monochrome*. La captación de imágenes se hizo con el programa informático *DeltaVision Softworx Resolve3D (Applied Precision, Issaquah, Washington, USA)* asociado al sistema.

Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con los programas ImageJ (NIH) y Adobe Photoshop CS5 (San José, CA, USA). Los “Line scans” también se realizaron empleando el programa ImageJ.

Las imágenes mostradas en las distintas series están adquiridas en idénticas condiciones y procesadas en paralelo para preservar las intensidades de fluorescencia relativas y poder ser comparadas. En todas las figuras la barra de escala representa 5 μ m.

4.1.1. Tinción con calcoflúor.

El calcoflúor es un fluorocromo que se une preferentemente a polímeros con enlaces β -(1-4)-C-glucopiranosidos, como la celulosa o la quitina. Gracias a la capacidad que presenta de emitir luz visible cuando es excitado con luz UV, permite visualizar las zonas donde se está sintetizando quitina activamente.

El calcoflúor se preparó en agua a una concentración de 10mg/ml. Para conseguir su total disolución se añadieron unas gotas de KOH 10N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

El calcoflúor se añadió sobre un cultivo líquido de células en fase logarítmica creciendo en YEPD a una concentración final de 50 μ g/ μ l y las células se incubaron durante 1 hora en agitación a 28°C. En el caso de las células portadoras de plásmidos el preinóculo de este cultivo se realizó en el medio selectivo correspondiente.

4.1.2. Fluorescencia directa con proteínas de fusión.

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz UV de longitud de onda de 395nm. La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello suele usarse como sistema de detección de la expresión y la localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para ello es necesario fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína en fase con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar esta proteína híbrida al microscopio de fluorescencia. Existen formas alélicas mutadas de la proteína GFP, como la eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein), la cual es más brillante que la versión original (λ excitación 488nm y λ emisión 507nm) y ha sido la empleada en este trabajo. La proteína roja fluorescente mCherry emite luz roja (λ absorción/ λ emisión, 578/610nm) al ser excitada y fue aislada de *Discosoma* spp.

Las células expresando proteínas marcadas con GFP o mCherry crecieron en medio SD específico suplementado con 0.2% de adenina para suprimir la autofluorescencia celular. Se visualizaron al microscopio células en crecimiento logarítmico.

4.1.3. Tinción con FM4-64.

El FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamonio)propil)-4-(6-(dietilamino)fenil)hexatrienil]piridina] es un colorante lipofílico fluorescente que permite observar el proceso de endocitosis desde su incorporación a la membrana plasmática, su transporte por la ruta endosomal y su llegada e incorporación a la membrana vacuolar como destino final (Vida and Emr, 1995). Para la visualización de los endosomas tempranos, se añade FM4-64 (*Invitrogen Molecular Probes*) a una concentración final de 10 μ M a un cultivo líquido de células en fase de crecimiento exponencial. Tras una incubación de 1 minuto se lava dos veces con medio

fresco y se observa al microscopio de fluorescencia durante los 4 minutos siguientes. Para la observación de las vacuolas el tiempo de incubación se prolonga a 30 minutos.

4.2. Microscopía confocal: experimento de colocalización.

Los experimentos de colocalización se realizaron utilizando el microscopio confocal Spinning disk OLYMPUS IX 81, equipado con una cabeza confocal CSUX1-A1 (*Yokogawa*), un objetivo Plan Apo 100x/1.4 y una cámara de adquisición EVOLVE de Photometrics. Para la fluorescencia se empleó el módulo de línea láser iLas (*ROPER Scientific*). En estos experimentos se tomaron imágenes procedentes de la excitación de los fluorocromos GFP y mCherry. Las proyecciones máximas analizadas corresponden a 3 planos centrales adquiridos en cada campo.

La adquisición de las imágenes se llevó a cabo mediante el programa Metamorph (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) asociado. Para su tratamiento y montaje se emplearon los programas ImageJ (NIH) y Adobe Photoshop CS5 (San José, CA, USA). Finalmente, para el análisis de la colocalización se utilizó el programa Imaris (módulos ImarisXT y MeasurementPro), concretamente la función de colocalización de puntos. Este análisis se llevó a cabo en el Servicio de Microscopía del Biozentrum, Universidad de Basilea, gracias a la inestimable colaboración de la Dra. Anne Spang.

Todas las técnicas empleadas en este trabajo se realizaron con células vivas.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.

El análisis estadístico de los datos se ha llevado a cabo con el programa GraphPad Prisma (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA*). Para comprobar la significación estadística de los resultados obtenidos se realizaron análisis de t-Student para muestras desapareadas y Anova. Los diferentes valores de significación estadística ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.0001$) están indicados (*, **, ***, ****).

6. ANÁLISIS Y DETECCIÓN DE PROTEÍNAS.

6.1. Obtención de extractos de proteínas.

Los extractos de proteínas se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por (Sambrook et al., 1989). Se recogieron 30ml de células en fase logarítmica mediante centrifugación y se resuspendieron en 150 μ l de tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 8, 0.1% Triton X-100 (*Sigma*), 150mM NaCl) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (2mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinina, 1 μ g/ml leupeptina). Se cubrió la suspensión con bolas de vidrio (0.45nm de diámetro, Sigma) y se rompieron en un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101* (Savant) en tres intervalos de 15 segundos a una intensidad de 5.5. El lisado se centrifugó 5 minutos a 10.000rpm para eliminar los restos de células, paredes celulares y bolas de vidrio. Todos los procesos se llevaron a cabo a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

El sobrenadante se recogió y se cuantificó la concentración de proteína de los extractos usando el método colorimétrico de (Bradford, 1976). Una vez ajustada la concentración de proteína de los extractos se añadió el Tampón de carga 4x (Tris-HCl 0.1M pH 6.8, SDS 2%, glicerol 2%, β -mercaptoetanol 0.7M y azul

de bromofenol 0.08%) y se desnaturizó durante 5 minutos a 100°C. Para la realización del SDS-PAGE e inmunodetección se cargaron típicamente 100µg de proteína total.

6.2. Separación electroforética, transferencia e inmunodetección.

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida (*BioRad*) (6.5%-10%) en condiciones desnaturizantes (1% SDS) a 150mV durante aproximadamente 1.5 horas, según la técnica descrita por (Laemmli, 1970). La composición del tampón de carrera es: Tris base 6g/l, SDS 2g/l y glicina 28g/l.

La transferencia de proteínas a membranas de PVDF (*ImmobilonTM-P, Millipore*), se realizó mediante el sistema *Mini-Trans-Blot* (*BioRad*) durante 1.5 a 2 horas a 400mA, usando como tampón de transferencia Tris-Glicina (Tris base 3g/l y glicina 14.4g/l).

Con el fin de evitar uniones inespecíficas del anticuerpo se procedió al bloqueo de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo empleada fue leche en polvo desnatada al 5% disuelta en TBST (Tris base 2.5g/l, NaCl 9g/l y 0.3% de Tween 20 (*Sigma*)). Después se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo, con la excepción del anticuerpo anti-GFP (*Living Colors*) que se incubó durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo las membranas se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBST y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*) durante 1 hora. Tras esta incubación se lavaron tres veces con TBST y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Se empleó el "kit" ECL de *Advanta*. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron utilizando películas *X-Ray -film 100NIF de Fujifilm*.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal 12CA5 (*Roche*) contra el epítipo HA, a una dilución 1:5000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón anti-GFP JL-8 (*Living Colors, Clontech*). Dilución 1:1000.
- Anticuerpo policlonal anti-7xHIS H-15 (*Santa Cruz*). Dilución 1:2000.
- Anticuerpo monoclonal anti-tubulina T5162 (*Sigma*). Dilución 1:5000.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-Chs3 (Trautwein et al., 2006). Dilución 1:2500.

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron:

- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (*BioRad*) a una dilución 1:10.000.
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano (*BioRad*) a una dilución 1:10.000.

6.3. Purificación en tándem de proteínas con marcaje HBH.

Para estudiar los niveles de ubiquitinación de Chs3, como primera aproximación, se llevó a cabo la purificación de la proteína y el análisis de las formas ubiquitinadas por Western blot. La proteína Chs3 con el marcaje HBH (dos colas de Histidina y una de Biotina) en su extremo terminal se purificó siguiendo el protocolo descrito en (Tagwerker et al., 2006). Este doble marcaje permite una primera purificación con la resina *Ni-NTA His-Bind® resin (Novagen)* y una segunda con la resina *Streptavidin Agarose (Thermo)*. La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes, como describimos a continuación.

Se recogieron 300ml de cultivo a DO_{600} 1.5 por centrifugación. Las células se lavaron con agua a 4°C y se congelaron en 12 tubos a -80°C. Después se procedió a temperatura ambiente. Las células se resuspendieron en 400 µl por tubo de Tampón 1 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Fosfato Sódico pH 8, 0.5% Tween-20 y 20mM imidazol). A continuación, las células se rompieron con bolitas de vidrio (0.45nm de diámetro, *Sigma*) usando un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101 (Savant)* en tres intervalos de 30 segundos a una intensidad de 5.5. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 2500g para eliminar los restos de células, paredes celulares y bolas de vidrio. Se añadieron 400µl adicionales de Tampón 1 al sobrenadante, que después se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 15.700g. A continuación se midió la cantidad de proteína del sobrenadante mediante el método de Bradford, y se añadieron 50µl de resina de Níquel (*Ni-NTA His-Bind® resin*), previamente equilibrados en Tampón 1, por cada miligramo de proteína total.

La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas y se realizaron los lavados que se indican a continuación:

2 lavados con 1 ml de Tampón 1.

2 lavados con 1 ml de Tampón 2 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Fosfato Sódico pH 6.3, 0.5% Tween-20).

2 lavados con 1 ml de Tampón 3 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Fosfato Sódico pH 6.3, 0.5% Tween-20 y 10mM imidazol).

2 lavados con 1 ml de Tampón 4 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Fosfato Sódico pH 6.3, 0.5% Tween-20 y 20mM imidazol).

La elución se realizó con 5 x 200µl de Tampón 5 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Fosfato Sódico pH 4.3, 0.5% Tween-20). A continuación, se ajustó el pH hasta 8-8.5 añadiendo un volumen de 1/20 de Tris/HCl pH 9.4. Tras esto, se incubó con 1µl de resina de estreptavidina (*Thermo*), previamente equilibradas en Tampón 3, por cada miligramo de proteína total. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se realizaron los siguientes lavados:

2 lavados con 1 ml de Tampón 6 (8M urea, 300mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 2% SDS).

4 lavados con 1ml de Tampón 7 (8M urea, 1.2M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8, 0.2% SDS).

Las proteínas se eluyeron en 55µl de Tampón de elución (5mM EDTA en Formamida) durante 10 minu-

tos a 95°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se le añadió de tampón de carga 4X y se sometió a Western blot.

6.4. Purificación de proteínas con marcaje –His.

El grado de ubiquitinación de Chs3 en diferentes condiciones se determinó mediante experimentos de purificación como se detalla a continuación.

Células expresando Chs3-3xHA y el plásmido His₇-ubiquitina y creciendo en fase logarítmica, se indujeron con 0.1mM de CuSO₄ durante 45 minutos. Después, se recogieron por centrifugación (3.200g, 4 minutos) las células procedentes de 50ml de cultivo a DO₆₀₀ 1, se lavaron con agua fría y se resuspendieron en 500µl de TCA al 12%. Las células así tratadas se lavaron en 500µl de Tris pH 8 1M, para restaurar el pH, y finalmente se recogieron por centrifugación. A este nivel las células se podían congelar y guardar a -80°C.

La lisis de las células se llevó a cabo con bolitas de vidrio (0.45nm de diámetro, Sigma) usando un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101 (Savant)* con un único ciclo de 40 segundos a una intensidad de 6, en 250µl de Tampón A (8M urea, 7mM NaH₂PO₄, 94mM Na₂HPO₄, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% Tween-20) conteniendo 1x del coctel de inhibición de proteasas descrito anteriormente. Para eliminar los restos celulares, se añadieron 500µl adicionales de Tampón A a las muestras, que después se centrifugaron durante 10 minutos a 15.000g, para finalmente recoger los sobrenadantes.

Tras medir la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, se guardaron 100µg de proteína como Extractos Totales tras añadirles Tampón de carga 2xSSR y hervirlos durante 5 minutos a 95°C. Por otra parte, el sobrenadante correspondiente a 0.5mg de proteína se llevó hasta completar 1 ml con Tampón A, y se mezcló con 70µl de *TALON® metal affinity resin (Clontech)*. Esta resina, previamente equilibrada con Tampón A y 15mM de imidazol para reducir uniones inespecíficas, une con alta afinidad moléculas de histidina. La mezcla se incubó a temperatura ambiente en un rotor orbital durante 2 horas.

Tras la incubación, las muestras se lavaron tres veces con Tampón A y otras tres veces con Tampón C (8M urea, 88mM NaH₂PO₄, 12mM Na₂HPO₄, 10mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% Tween-20), centrifugando entre cada lavado a baja revolución y eliminando el sobrenadante con cuidado de no arrastrar la resina.

Finalmente, las proteínas se eluyeron en 40µl de Tampón de carga 2xSSR (4% SDS, 0.25M Tris-HCl pH 6.8, 10% sacarosa, 0.025% azul de bromofenol, 1% β-mercaptoetanol) durante 3 minutos a 95°C, para ser cargadas posteriormente en un gel SDS-PAGE. La proteína Chs3-3xHA se visualizó por separación electroforética e inmunodetección según el protocolo explicado previamente.

Para prevenir la desubiquitinación de proteínas durante el procedimiento experimental, se añadió a todos los búferes el inhibidor de desubiquitininasas N-etilmaleimida (NEM) a una concentración de 20mM.

Con este protocolo purificamos las formas ubiquitinadas de las proteínas, de manera que sólo las formas ubiquitinadas de Chs3 deberían ser las visibles. Sin embargo, pueden observarse de manera ocasional la aparición de leves bandas en los controles negativos en los que la ubiquitina no está marcada. Esto probablemente se deba a una unión inespecífica de la propia Chs3-3xHA a la resina.

6.5. Co-inmunoprecipitación.

Para realizar este tipo de experimentos se partió de 200 ml de cultivo en fase de crecimiento logarítmico. Las células se recogieron por centrifugación (3.200g, 4 minutos) y se lavaron con agua fría. Después, se lavaron con 1 ml de Tampón "STOP" (154mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Na₃, 10mM NaF) y con 1.5ml de Tampón de Lavado (50mM Tris pH 7.5, 5mM EDTA).

Las células así tratadas, se resuspendieron en 800µl de Tampón de lisis (50mM Tris pH 7.5, 200mM NaCl, 5mM EDTA, 0.1% Tritón) con 2x del cóctel de inhibidores de proteasas (2mM PMSF, 1µg/ml aprotinina, 1µg/ml leupeptina). La lisis se llevó a cabo con bolas de vidrio (0.45nm de diámetro, *Sigma*) en un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101 (Savant)* en tres intervalos de 30 segundos a una intensidad de 5.5. El lisado se centrifugó 2 minutos a 10.000rpm para eliminar los restos celulares y las bolas de vidrio.

Tras medir la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, 100µg de proteína se guardaron como Extractos Totales, tras añadirles Tampón de carga 4x y hervirlos durante 5 minutos a 95°C. El resto de la muestra se diluyó con Tampón de lisis hasta conseguir una concentración de proteína final de 2mg/ml. Después, se incubó 1ml de esta muestra con 50µl de anti-HA o anti-GFP *MicroBeads (Miltenybiotec)* y BSA al 2%, durante 30 minutos a 4°C en un rotor orbital.

Tras la incubación, la mezcla se vertió en una µColumna encajada en el imán separador µMACSTM *Separator* y se procedió a realizar dos series de lavados: 4 lavados con 400µl de Tampón de Lavado 1 (150mM NaCl, 1% Igepal CA-630 (anteriormente NP-40), 0.5% deoxicolato sódico 0.1% SDS, 50mM Tris HCl pH 8.0) y 2 lavados con 200µl de Tampón de Lavado 2 (20mM Tris HCl pH 7.5).

Las proteínas unidas específicamente a las MicroBeads anti-HA o anti-GFP se eluyeron con 50µl del Tampón de elución (50mM Tris-HCl pH 6.8, 100mM DTT, 1% SDS, 1mM EDTA, 0.005% azul de bromofenol, 10% glicerol) previamente calentado a

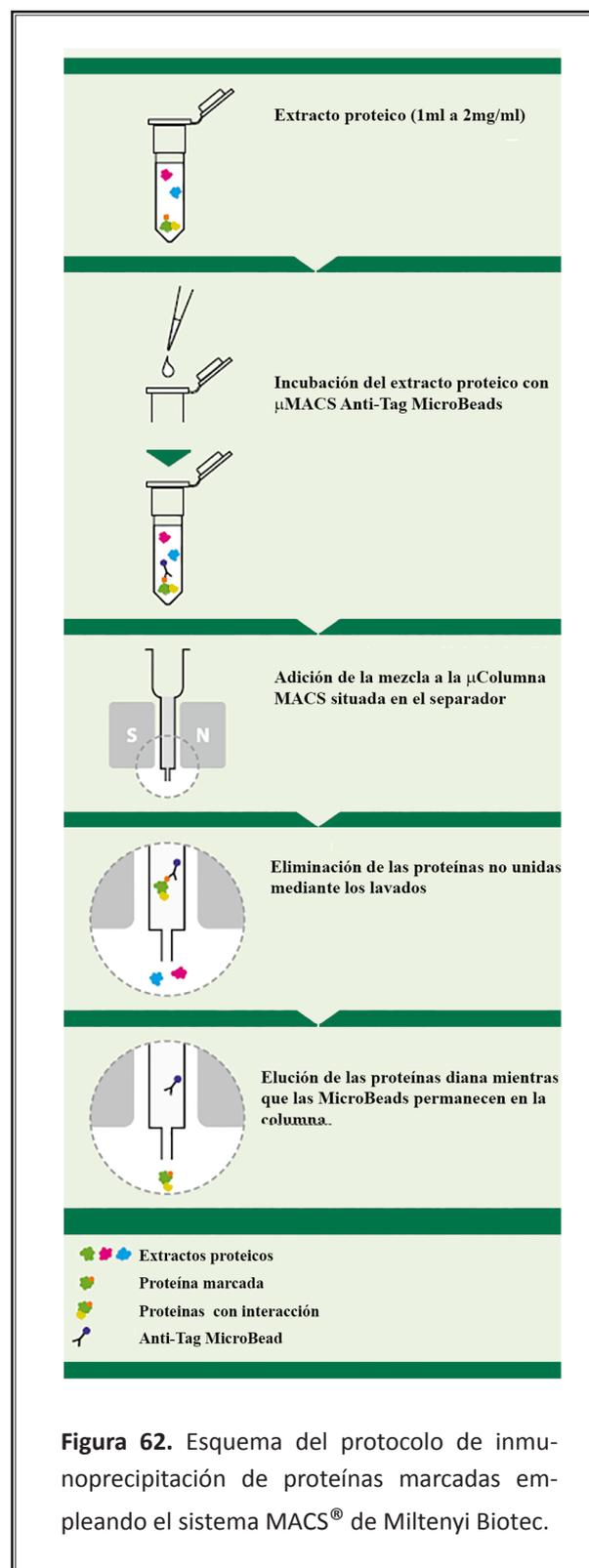


Figura 62. Esquema del protocolo de inmunoprecipitación de proteínas marcadas empleando el sistema MACS® de Miltenyi Biotec.

MATERIALES Y MÉTODOS

95°C vertido directamente sobre la columna. Finalmente, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se separaron en un gel SDS-PAGE al 7.5%. Las proteínas se visualizaron por inmunodetección.

En los casos en los que una reacción de “crosslinking” era necesaria, el extracto proteico ajustado a 2mg/ml se incubó con 0.1mM del agente crosslinker DSP (*Pierce*) disuelto en DMSO, durante 30 minutos a 22°C. Las muestras se trataron después con 100mM de Tris-HCl pH7.4, durante 15 minutos a 22°C para neutralizar los grupos reactivos libres. Estas muestras posteriormente se incubaron con las *MicroBeads* (*Miltenybiotec*) y se procedió como ya hemos descrito.

Los niveles de co-inmunoprecipitación se determinaron midiendo la intensidad de las bandas con el programa *Quantity One* (*BioRad Laboratories*, US) y después se estableció la relación entre la cantidad de proteína purificada y la co-inmunoprecipitada. Los resultados cuantitativos presentados son la media de tres experimentos independientes.

6.6. Co-inmunoprecipitación entre moléculas de Chs3.

La interacción directa entre moléculas de Chs3 se determinó de la siguiente manera: se recogieron por centrifugación células provenientes de un cultivo de 100ml en crecimiento exponencial y se lavaron con agua fría. La lisis se llevó a cabo con bolas de vidrio en un agitador *Fast-Prep FP120 Bio101* (*Savant*) en 200µl de tampón de lisis (50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tritón, 150mM NaCl) con 1x del cóctel de inhibidores de proteasas anteriormente descrito. Los lisados se centrifugaron a 4°C, 5 minutos a 16.000g para eliminar los restos celulares.

Tras medir la cantidad de proteína mediante el método de Bradford, 2mg de proteína total de los extractos se diluyó hasta un volumen de 400µl con tampón IP (50mM Tris-HCl pH 8.0, 0.1% Tritón, 150mM NaCl, 2mg/ml BSA). Esta suspensión se incubó con anti-HA HA1.1 (*Covance*) a una dilución 1:75, a 4°C durante 2 horas, y transcurrido este tiempo se mezcló con 0.1mg/ml de proteína A sefarosa (*GE Healthcare*) y se incubó durante otras 2 horas. Alternativamente, el anticuerpo policlonal anti-GFP (*Invitrogen*) también se empleó para la co-inmunoprecipitación a una dilución 1/100.

Tras las incubaciones, las bolitas de sefarosa se lavaron tres veces con tampón de lisis. La elución de las proteínas se llevó a cabo en 50µl de tampón de carga 4x a 95°C durante 5 minutos. 20µl de las muestras se separaron en geles SDS-PAGE al 7.5%, y las proteínas se visualizaron por inmunodetección.

APÉNDICE

Tabla 2. Estirpes de *S.cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM67	W303;Mata; <i>can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,12 trp1-1</i>	Colección laboratorio
CRM659	BY4741; Mat a ; <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
CRM1435	BY4741; <i>chs3Δ::NAT</i>	Colección laboratorio
CRM1857	BY4741; <i>vps27Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1860	BY4741; <i>vps28Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1861	BY4741; <i>vps36 Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1858	BY4741; <i>vps24 Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1859	BY4741; <i>vps35 Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1950	BY4741; <i>snx3Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM1886	BY4741; <i>vps27Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM1880	BY4741; <i>vps35Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM1937	BY4741; <i>vps27Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3 vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM1893	BY4741; <i>vps28Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM1891	BY4741; <i>vps36Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM1887	BY4741; <i>vps2 Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2494	BY4741; <i>vps28Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3 VPS27-GFP::hph</i>	Este trabajo
CRM2659	BY4741; <i>vps28Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3 VPS35-3xHA::hph</i>	Este trabajo
CRM2086	BY4741; <i>RSP5::rsp5-1-Kan^R</i>	Li et al., 2011
CRM2087	BY4741; <i>RSP5::rsp5-sm1-Kan^R</i>	Li et al., 2011
CRM2088	BY4741; <i>RSP5::rsp5-3-Kan^R</i>	Li et al., 2011
CRM2124	BY4741; <i>RSP5::rsp5-1-Kan^R chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM1627	BY4741; <i>syp1Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Sacristan et al., 2012
CRM2481	BY4741; <i>rvs161Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM1737	BY4741; <i>chs5Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Colección laboratorio
CRM2343	BY4741; <i>chs5Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3 vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM 2296	BY4741; <i>art1Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2345	BY4741; <i>art2Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2346	BY4741; <i>art3Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2347	BY4741; <i>art4Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2348	BY4741; <i>art5Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2349	BY4741; <i>art6Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2350	BY4741; <i>art7Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2351	BY4741; <i>art8Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2831	BY4741; <i>art9Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF
CRM2352	BY4741; <i>art10Δ::kanMx4</i>	EUROSCARF

APÉNDICE

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM2325	BY4741; <i>art1Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2366	BY4741; <i>art2Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2429	BY4741; <i>art3Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2367	BY4741; <i>art4Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2368	BY4741; <i>art5Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2370	BY4741; <i>art6Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2372	BY4741; <i>art7Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2373	BY4741; <i>art8Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2375	BY4741; <i>art9Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2396	BY4741; <i>art10Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT</i>	Este trabajo
CRM2449	BY4741; <i>art1Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2398	BY4741; <i>art2Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2450	BY4741; <i>art3Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2479	BY4741; <i>art4Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2400	BY4741; <i>art5Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2417	BY4741; <i>art6Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2411	BY4741; <i>art7Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2451	BY4741; <i>art8Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2413	BY4741; <i>art9Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM2414	BY4741; <i>art10Δ::kanMx4 chs3Δ::NAT vps35Δ::hph</i>	Este trabajo
CRM926	BY4741; <i>end4Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Reyes et al., 2007
CRM101	W303; <i>chs3Δ::URA3</i>	Colección laboratorio
CRM1731	W303; <i>chs3Δ::URA3 SEC7-RFP::TRP1</i>	Colección laboratorio
CRM1701	W303; <i>rcy1Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2042	W303; <i>rcy1Δ::kanMx4 chs3Δ::URA3 SEC7-RFP::TRP1</i>	Este trabajo
CRM2195	W303; <i>CHS5-mCherry::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2147	W303; <i>APS1-mCherry::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2150	W303; <i>ENT5-mCherry::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2181	W303; <i>ENT3-mCherry::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2197	W303; <i>GGA1-mCherry::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM924	BY4742; <i>chs3Δ::URA3</i>	Colección laboratorio
CRM2680	BY4742; <i>gga1Δ::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2673	BY4742; <i>gga2Δ::hph chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2682	BY4742; <i>gga1Δ::NAT gga2Δ::hph chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2678	BY4742; <i>ent3Δ::NAT chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo
CRM2675	BY4742; <i>ent5Δ::hph chs3Δ::URA3</i>	Este trabajo

Tabla 3. Cepas de *E.coli* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Procedencia
DH5α	<i>SupE44, lacU169 (80lacZM15), hsdR17, RecA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Stratagene
DH10β	<i>F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 endA1 recA1 deoR Δ(ara,leu)7697 araD139 galU galK nupG rpsL λ</i>	Stratagene

Tabla 4. Oligonucleótidos más relevantes empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
CHS3D-pUG F	CGGTTATAAACGTTTACCGATTGCAAAGTTCAGCTGAAG-CTTCGTACG	Delección <i>CHS3</i> con serie pUG
CHS3D-pUG R	CTGTAATTGCCTTAGCCACGTAATATGTGCGCATAGGCCAC-TAGTGGATCTG	Delección <i>CHS3</i> con serie pUG
Chs3 test F	AACGCGTTATTGGCGCTG	Comprobación delección <i>chs3Δ</i>
Chs3 test R	AGTCCCTTGAAAGAGAC	Comprobación delección <i>chs3Δ</i>
Chs3D::KanMx4 F	GGTCCATTTTCTTCAAAGGTCCTGTTTACTATCCGCAG-GCAGCTGAAGCTTCGTACG	Delección <i>CHS3</i> con casete kanamicina
Chs3D::KanMx4 R	TAAATAAGTTACACACAACCATATCAACTTGTAAGTATCA-CAGCAGATCCACTAGTGGCCTATGC	Delección <i>CHS3</i> casete kanamicina
Chs5D::NATMx4 F	CATGTTACGTTTCCGTTTTAGAACCTGGTCGAGTAGC-GAATACGACATGGAGGCCAGAA	Delección <i>CHS5</i>
Chs5D::NATMx4 R	AAATAAACGTGCGTCGTGGAAGTCATTGAAGGCATCCATTA-AACACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>CHS5</i>
Chs5D F	CGGCCCTTCAAGTTCTCC	Comprobación delección <i>chs5Δ</i>
Chs5D R	GCGGCTACTGAGTACCCC	Comprobación delección <i>chs5Δ</i>
Rcy1 sec1	CTGGGTATCTTCTGGTTCC	Comprobación mutante <i>rcy1Δ</i>
Rcy1 sec2	GAAAGGGAGCGTACTGAAC	Comprobación mutante <i>rcy1Δ</i>
Vps35::hphF	CACAATGGCGTATGCGGACTCACCAGAAAATGCGATCGCT-GTTATCGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>VPS35</i>
Vps35::hphR	GTACTACAAGTGCCTCGAAAATGGTGGATTGGGA-TATACTTCAGACACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>VPS35</i>
Vps35compF	GTCACTTCGTCTTAAAGGGG	Comprobación delección <i>vps35Δ</i>
Vps35compR	ATTTGTGAGCGCATTGGCGC	Comprobación delección <i>vps35Δ</i>
Vps27D pAG25 F	TTTTTGCTAAGGTGAATGAGTAGTGAGTAAAGAACTA-AGAACAGTCGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>VPS27</i>

APÉNDICE

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Vps27D pAG25 R	AAGCGCTAGTTCCTTTTACAATAACATAGAAAAGGCTA- CAATAAACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>VPS27</i>
Vps27 test F	CAGCAGAATCATCTTGCTCG	Comprobación delección <i>vps27Δ</i>
Vps27 test R	TAGCTGCAAGCCAGGTGGTC	Comprobación delección <i>vps27Δ</i>
Gga1D::NAT F	GGGACAAGTCACTACTTCAAGTATAACCCAGACAA- GAGTCTTTTACGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>GGA1</i>
Gga1D::NAT R	TCTTACCGAATTTGATTATATTGTGGGCAAACCTGGTCGTGC- CCGACACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>GGA1</i>
Gga1DCompR	AGCAACTACAACCAGGGTCT	Comprobación delección <i>gga1Δ</i>
Gga2D::hph F	GCTAATCGTGACTGCATCATGTCCCATCCGCACTCA- CATAGCACGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>GGA2</i>
Gga2D::hph R	GGTAACGTAAAAACAGCAGTTTCTTACGCTTGGGTG- GAGTTGACAGACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>GGA2</i>
Gga2DCompF	GTGGCAGCACTCATTATTTG	Comprobación delección <i>gga2Δ</i>
Gga2DCompR	CAGTGGTTATGAGGATGGCG	Comprobación delección <i>gga2Δ</i>
Ent3D::NAT F	CAGGAAGGTGTAGGGACGTCGATAGGAGATCACATCGTTA- ATTAGCGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>ENT3</i>
Ent3D::NAT R	GGATGATGTATGGTTATTATTGGTATTCTGTTCTTGTGAA- CAGCACACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>ENT3</i>
Ent3CompR	GAAGGGCACTTCAACTCTCG	Comprobación delección <i>ent3Δ</i>
Ent5D::hph F	CGTTCCAATTGCATAAATACCAACACCATACAAAATGGACT- CATTTCGACATGGAGGCCAGAAT	Delección <i>ENT5</i>
Ent5D::hph R	GGGAGATGAAGGGGTATTGGTGATTAGACCAACGACTTG- GAGTAACTGGATGGCGGCGTTA	Delección <i>ENT5</i>
Ent5CompR	GGCGACGAGTATATGGAAGA	Comprobación delección <i>ent5Δ</i>
APS1 Ct pFA6a F	CACCATGGAGAGCAACGCTAATCTTGAAAGGGTATT- GAGTCGGATCCCCGGGTTAATTA	Marcaje C-terminal Aps1mCherry
APS1 Ct pFA6a R	TTTGCGACAGACGGTAATAATAGTAGGGCCCCTTGC- CCCCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Aps1mCherry
Test Aps1 Ct	CCATCGGTTTGTGCGAAAC	Comprobación marcaje Aps1mCherry
ENT5 Ct pFA6a F	TGCATTTTCCGACTTATTCTCTACTCCAAGTCGTTGGTCCG- GATCCCCGGGTTAATTA	Marcaje C-terminal Ent5mCherry
ENT5 Ct pFA6a R	AATTTGTTGACTGTATTGAATGTATTGGGAGATGAAGGGG- GAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Ent5mCherry
Test Ent5 Ct	GATGGCCCAAAGTCAGAC	Comprobación marcaje Ent5mCherry
Chs5mCherry F	CAGCAACAGTAATAAGAAGAAGAATAAGAAGAATA- AGAAGAAAGGGAAAAAGAAACGGATCCCCGGGTTAATTA	Marcaje C-terminal Chs5mCherry

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
Chs5mCherry R	GCTGAGGGATTCTCAGTCGAAAAATAAACGTGCGTCGTG-GAACTCATTGAAGGCGAATTCGAGCTCGTTTA	Marcaje C-terminal Chs5mCherry
Chs5mCherry compF	CGAGCCATCCAATGAAGATG	Comprobación marcaje Chs5mCherry
Gga1mCherryF	CTGCACCAAGGGTGATTCTGAAGGAAGAATCGGGCACGAC-CAGTTTGCCCAATAACGATCCCCGGGT	Marcaje C-terminal Gga1mCherry
Gga1mCherryR	ACTCTGTTCTCTGTAATATAATATGGCATCTACTTTTTTTT-CAACTTCTCTACCGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Gga1mCherry
Gga1mCherry compF	CCAATCGGATCACTTACGCA	Comprobación marcaje Gga1mCherry
Ent3 mCherry F	ACAGAATACCAATAATAACCATACATCATC-CAAAGAAATCGATTACTTTCCTTTCGGATCCCCGGGT-TAATTAA	Marcaje C-terminal Ent3mCherry
Ent3 mCherry R	CCTGTTACAAAGTACTTTCTATTGTTATAAAACATTTACATAT-TGTGTAACAAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Ent3mCherry
Ent3 mCherry compF	GATTACCCAGCTATTGCGG	Comprobación marcaje Ent3mCherry
Vps27GFP::hphF	GAGGAAAGGCCGCTAGTGGTCAAGAGGAAGTCTAA-TAGAGCTTCGGATCCCCGGGTAAATTAA	Marcaje C-terminal Vps27-GFP
Vps27GFP::hphR	TATTTATAAGCGCTAGGTTTCTTTTTACAAATACA-TAGAAAAGGCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Vps27-GFP
Vps27GFPcompF	GGAACACAGGCAGTGCAAGA	Comprobación marcaje Vps27-GFP
Vps35GFP::hphF	GTCAAAGAGAAGTTGACGATCGTTTCAAAGTCATATATGTA-TAGTCGGATCCCCGGGTAAATTAA	Marcaje C-terminal Vps35-GFP
Vps35GFP::hphR	TGTGTAGTTTTTTTTTATCTTGGGCATGTACGAAGAGCAAG-TACGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Vps35-GFP
Vps35GFPcompF	GCCTCTATGATTACCAACT	Comprobación marcaje Vps35-GFP
VPS35CtpFA6a F	TCAAAGAGAAGTTGACGATCGTTTCAAAGTCATATATG-TACGGATCCCCGGGTAAATTAA	Marcaje C-terminal Vps35-3xHA
VPS35CtpFA6a R	TAGTTTTTTTTTATCTTGGGCATGTACGAAGAGCAAG-TACGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Marcaje C-terminal Vps35-3xHA
PIN2.GFP.F	ATTATCAATCATATCAGGGATATAAACCAAACCAAAGCGA-TAGATATTACCGATCCCCGGGTAAATTAA	Marcaje C-terminal Pin2-GFP
PIN2.GFP.R	AAAATGTCTGACTGATTATTCAAAGAAGGGGGAATATA-TATTTACCTCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAG	Marcaje C-terminal Pin2-GFP
PIN2 C-t test F	CTGGTAGCAACAACGCTCAT	Comprobación marcaje Pin2-GFP
Chs3 hbh for	GAGACCAAGATCGC	Amplificación C-terminal de Chs3HBH
Chs3 L24A PvuI F	CCTTAATCAAGATGAAGAGTCTCTAGCTCGATCGCGACA-CAGTGTGGCTCAGGAGCACC	Mutagénesis dominio de interacción de Chs3 con AP-1.
Chs3 L24A PvuI R	GGTGCTCCTGAGCCGACACTGTGTGCGATCGAGC-TAGAGACTCTCTCATCTTGATTAAGG	Mutagénesis dominio de interacción de Chs3 con AP-1.

APÉNDICE

Nombre	Secuencia 5'-3'	Finalidad
CHS3 K136A	GCGGAAGACGAATTCGATCGAGATGGTGAT	Mutagénesis de la lisina 136 de Chs3 por arginina
CHS3 K1157R EcoRV	TCACTTTCCTCCCGCCCGATTGAGGATATTCTTCCTT	Mutagénesis de la lisina 1157 de Chs3 por arginina
CHS3 KKK118/119/123RRR PvuI	GATATGAATACTACCGATCGGCGGGCTTCGTTCAATATCTGATGAAGGTGTT	Mutagénesis de las lisinas 118/119/123 de Chs3 por arginina
CHS3 KK1125/1126RR SacI	ATTCTCGTCTTGAGCTCGTTCGATTACCTCCCGC	Mutagénesis motivo de lisina 1125/1126 de Chs3
Chs3-UbiF	GTCCCATTTTCTCAAAGGTCCTGTTTAGACTATCCGCAG-GAAAGATGCAGATTTTCGTCAAGAC	Construcción ^{UB} Chs3
Chs3-UbiR	TTAAGGTTTCAGATAGTAGTCATCAGGATCATCTCCATT-CAAGCCGGTCATACCACCTCTTAGCCTTAGCA	Construcción ^{UB} Chs3

Tabla 5. Plásmidos empleados en este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM1130	pRS315::Chs3	Sacristán et al., 2013
CRM1099	pRS314::Chs3	Colección laboratorio
CRM1131	pRS315::Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM1256	pRS315:: ^{Δ126} Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM1682	pRS315:: ^{Δ37} Chs3-GFP	Rockenbauch et al., 2012
CRM2084	pRS315:: ^{L24A} Chs3-GFP	Este trabajo
CRM2514	pRS315:: ^{L24A} Chs3 ^{Δ37} -GFP	Este trabajo
CRM1255	pRS315:: ^{Δ63} Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM2138	pRS315:: ^{Δ26-125} Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM2136	pRS315:: ^{Δ63-125} Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM2140	pRS315:: ^{Δ15-140} Chs3-GFP	Sacristán et al., 2013
CRM1288	pRS315:: ^{Δ63} hs3-3xHA	Sacristán et al., 2013
CRM2141	pRS315:: ^{Δ63-125} Chs3-3xHA	Sacristán et al., 2013
CRM1290	pRS315:: ^{Δ126} Chs3-3xHA	Sacristán et al., 2013
CRM1735	pRS315::Chs3 ^{K1157R} -GFP (Chs3 ^{1K})	Este trabajo
CRM1510	pRS315::Chs3 ^{K118/119/123/136R} -GFP (Chs3 ^{4K})	Este trabajo
CRM1740	pRS315::Chs3 ^{K118/119/123/136/1157R} -GFP (Chs3 ^{5K})	Este trabajo

Cepa	Genotipo	Origen / Referencia
CRM2496	pRS315::Chs3 ^{K118/119/123/136/492/511/586/592/612/702/723/1125/1126/1157R} -GFP (Chs3 ^{14K})	Este trabajo
CRM2489	pRS315::Chs3 ^{K492/511/586/592/612/702/723R} -GFP (Chs3 ^{K492-723R})	Este trabajo
CRM2272	pRS315:: ^{L24A} Chs3 ^{K1157R} -GFP	Este trabajo
CRM1084	pRS315::Chs3-3xHA	Sacristán et al., 2013
CRM2270	pRS315::Chs3 ^{1K} - 3xHA	Este trabajo
CRM2262	pRS315::Chs3 ^{4K} - 3xHA	Este trabajo
CRM2538	pRS315::Chs3 ^{14K} -3xHA	Este trabajo
CRM1747	pRS315:: ^{Ub} Chs3-GFP	Este trabajo
CRM1715	pRS315::GFP- <i>Snc1</i>	A. Spang Lab. collection
CRM2811	pRS315::Tlg1-GFP	J. Gerst Lab. collection
CRM2813	pRS315::Tlg2-GFP	J. Gerst Lab. collection
CRM1272	pRS315::Chs3- <i>HBH</i>	Este trabajo
CRM2211	YEplac195	Parker et al., 2007
CRM2213	YEplac195-pCUP1-ubiquitin-7xHis	Parker et al., 2007
CRM1300	pRS423::CHS7	Sacristán et al., 2013
CRM1103	YEplac112-pCUP-ubiquitin-HA	Galan et al., 1996

BIBLIOGRAFIA

- Acconcia, F., S. Sigismund, and S. Polo.** 2009. Ubiquitin in trafficking: the network at work. *Exp Cell Res.* 315:1610-1618.
- Albuquerque, C.P., M.B. Smolka, S.H. Payne, V. Bafna, J. Eng, and H. Zhou.** 2008. A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics.* 7:1389-1396.
- Alvaro, C.G., A.F. O'Donnell, D.C. Prosser, A.A. Augustine, A. Goldman, J.L. Brodsky, M.S. Cyert, B. Wendland, and J. Thorner.** 2014. Specific α -arrestins negatively regulate *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response by down-modulating the G-protein-coupled receptor Ste2. *Mol Cell Biol.* 34:2660-2681.
- Anand, V.C., L. Daboussi, T.C. Lorenz, and G.S. Payne.** 2009. Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Mol Biol Cell.* 20:1592-1604.
- Babst, M.** 2014. Quality control: quality control at the plasma membrane: one mechanism does not fit all. *J Cell Biol.* 205:11-20.
- Balderhaar, H.J., H. Arlt, C. Ostrowicz, C. Brocker, F. Sundermann, R. Brandt, M. Babst, and C. Ungermann.** 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.
- Balderhaar HJ, U.C.** 2013. CORVET and HOPS tethering complexes—coordinators of endosome and lysosome fusion. *J Cell Sci.* 123:1307-1316.
- Barfield, R.M., J.C. Fromme, and R. Schekman.** 2009. The exomer coat complex transports Fus1p to the plasma membrane via a novel plasma membrane sorting signal in yeast. *Mol Biol Cell.* 20:4985-4996.
- Becuwe, M., A. Herrador, R. Haguenaer-Tsapis, O. Vincent, and S. Leon.** 2012a. Ubiquitin-mediated regulation of endocytosis by proteins of the arrestin family. *Bioch Res Int.* 2012:242764.
- Becuwe, M., and S. Léon.** 2014. Integrated control of transporter endocytosis and recycling by the arrestin-related protein Rod1 and the ubiquitin ligase Rsp5. *Elife.* 3:e03307
- Becuwe, M., N. Vieira, D. Lara, J. Gomes-Rezende, C. Soares-Cunha, M. Casal, R. Haguenaer-Tsapis, O. Vincent, S. Paiva, and S. Leon.** 2012b. A molecular switch on an arrestin-like protein relays glucose signaling to transporter endocytosis. *J Cell Biol.* 196:247-259.
- Belgareh-Touze, N., S. Leon, Z. Erpapazoglou, M. Stawiecka-Mirota, D. Urban-Grimal, and R. Haguenaer-Tsapis.** 2008. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans.* 36:791-796.
- Blondel, M.O., J. Morvan, S. Dupre, D. Urban-Grimal, R. Haguenaer-Tsapis, and C. Volland.** 2004. Direct sorting of the yeast uracil permease to the endosomal system is controlled by uracil binding and Rsp5p-dependent ubiquitylation. *Mol Biol Cell.* 15:883-895.
- Boehm, M., and J.S. Bonifacino.** 2001. Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell.* 12:2907-2920.

BIBLIOGRAFÍA

- Bonifacino, J.S.** 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:23-32.
- Bonifacino, J.S.** 2014. Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Biol.* 204:7-17.
- Bonifacino, J.S., and B.S. Glick.** 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell.* 116:153-166.
- Bonifacino, J.S., and A. Hierro.** 2011. Transport according to GARP: receiving retrograde cargo at the trans-Golgi network. *Trends Cell Biol.* 21:159-167.
- Bonifacino, J.S., and J.H. Hurley.** 2008. Retromer. *Curr Opin Cell Biol.* 20:427-436.
- Bonifacino, J.S., and R. Rojas.** 2006. Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7:568-579.
- Bowers, K., and T.H. Stevens.** 2005. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1744:438-454.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Breidenbach, M.A., K.K. Palaniappan, A.A. Pitcher, and C.R. Bertozzi.** 2012. Mapping yeast N-glycosites with isotopically recoded glycans. *Mol Cell Proteomics.* 11:M111.015339.
- Brocker, C., S. Engelbrecht-Vandre, and C. Ungermann.** 2010. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Curr Biol.* 20:R943-952.
- Bulawa, C.E.** 1993. Genetics and Molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol.* 47:505-534.
- Cabib, E., and J. Arroyo.** 2013. How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Microbiol.* 11:648-655.
- Cabib, E., N. Blanco, and J. Arroyo.** 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. *Eukaryot Cell.* 11:388-400.
- Clague, M., H. Liu, and S. Urbé.** 2012. Governance of endocytic trafficking and signaling by reversible ubiquitylation. *Dev Cell.* 23:457-467.
- Collins, B.M.** 2008. The structure and function of the retromer protein complex. *Traffic.* 9:1811-1822.
- Conibear, E., and T.H. Stevens.** 1998. Multiple sorting pathways between the late Golgi and the vacuole in yeast. *Biochim Biophys Acta.* . 1404:211-230.
- Copic, A., T.L. Starr, and R. Schekman.** 2007. Ent3p and Ent5p exhibit cargo-specific functions in trafficking proteins between the trans-Golgi network and the endosomes in yeast. *Mol Biol Cell.* 18:1803-1815.

- Cos, T., R.A. Ford, J.A. Trilla, A. Duran, E. Cabib, and C. Roncero.** 1998. Molecular analysis of Chs3 participation in chitin synthase III activity. *Eur. J. Biochem.* 256:419-426.
- Costaguta, G., M.C. Duncan, G.E. Fernandez, G.H. Huang, and G.S. Payne.** 2006. Distinct roles for TGN/endosome epsin-like adaptors Ent3p and Ent5p. *Mol Biol Cell.* 17:3907-3920.
- Cowles, C.R., W.B. Snyder, C.G. Burd, and S.D. Emr.** 1997. Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J.* 16:2769-2782.
- Crapeau, M., A. Merhi, and B. André.** 2014. Stress conditions promote yeast Gap1 permease ubiquitylation and down-regulation via the arrestin-like Bul and Aly proteins. *J Biol Chem.* 289:22103-22116.
- Chen, L., and N.G. Davis.** 2002. Ubiquitin-independent entry into the yeast recycling pathway. *Traffic.* 3:110-123.
- Chen, S.H., S. Chen, A.A. Tokarev, F. Liu, G. Jedd, and N. Segev.** 2005. Ypt31/32 GTPases and their novel F-box effector protein Rcy1 regulate protein recycling. *Mol Biol Cell.* 16:178-192.
- Chen, S.H., A.H. Shah, and N. Segev.** 2011. Ypt31/32 GTPases and their F-Box effector Rcy1 regulate ubiquitination of recycling proteins. *Cell Logist.* 1:21-31.
- Choi, W., A. Sburlati, and E. Cabib.** 1994. Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the *CAL1* and *CAL3* genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91:4727-4730.
- Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero, and P. Hieter.** 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene.* 110:119-122.
- Chu, D.S., B. Pishvaei, and G.S. Payne.** 1996. The light chain subunit is required for clathrin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 271:33123-33130.
- Daboussi, L., G. Costaguta, and G.S. Payne.** 2012. Phosphoinositide-mediated clathrin adaptor progression at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol.* 14:239-248.
- de Leon, N., M. Hoya, M.A. Curto, S. Moro, F. Yanguas, C. Doncel, and M.H. Valdivieso.** 2016. The AP-2 complex is required for proper temporal and spatial dynamics of endocytic patches in fission yeast. *Mol Microbiol.* 100:409-424.
- Delley, P.A., and M.N. Hall.** 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* 147:163-174.
- DeMarini, D.J., A.E.M. Adams, H. Fares, C. De Virgilio, G. Valle, J.S. Chuang, and J.R. Pringle.** 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.
- Deng, Y., Y. Guo, H. Watson, W.C. Au, M. Shakoury-Elizeh, M.A. Basrai, J.S. Bonifacino, and C.C. Philpott.** 2009. Gga2 mediates sequential ubiquitin-independent and ubiquitin-dependent steps in the trafficking of ARN1 from the trans-Golgi network to the vacuole. *J Biol Chem.* 284:23830-23841.

BIBLIOGRAFÍA

- Duncan, M.C., and G.S. Payne.** 2003. ENTH/ANTH domains expand to the Golgi. *Trends Cell Biol.* 13:211-215.
- Epp, N., R. Rethmeier, L. Kramer, and C. Ungermann.** 2011. Membrane dynamics and fusion at late endosomes and vacuoles--Rab regulation, multisubunit tethering complexes and SNAREs. *Eur J Cell Biol.* 90:779-785.
- Erpapazoglou, Z., M. Froissard, I. Nondier, E. Lesuisse, R. Haguenauer-Tsapis, and N. Belgareh-Touze.** 2008. Substrate- and ubiquitin-dependent trafficking of the yeast siderophore transporter Sit1. *Traffic.* 9:1372-1391.
- Eugster, A., E.I. Pecheur, F. Michel, B. Winsor, F. Letourneur, and S. Friant.** 2004. Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body. *Mol Biol Cell.* 15:3031-3041.
- Feyder, S., J.O. De Craene, S. Bar, D.L. Bertazzi, and S. Friant.** 2015. Membrane trafficking in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* model. *Int J Mol Sci.* 16:1509-1525.
- Foote, C., and S.F. Nothwehr.** 2006. The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast. *J Cell Biol.* 173:615-626.
- Fotin, A., Y. Cheng, P. Sliz, N. Grigorieff, S.C. Harrison, T. Kirchhausen, and T. Walz.** 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature.* 432:573-579.
- Ghaddar, K., A. Merhi, E. Saliba, E.M. Krammer, M. Prevost, and B. Andre.** 2014. Substrate-induced ubiquitylation and endocytosis of yeast amino acid permeases. *Mol Cell Biol.* 34:4447-4463.
- Goldstein, A.L., and J.H. McCusker.** 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15:1541-1553.
- Gomez, A., J. Perez, A. Reyes, A. Duran, and C. Roncero.** 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.
- Ha, S.A., J. Torabinejad, D.B. DeWald, M.R. Wenk, L. Lucast, P. De Camilli, R.A. Newitt, R. Aebersold, and S.F. Nothwehr.** 2003. The synaptojanin-like protein Inp53/Sjl3 functions with clathrin in a yeast TGN-to-endosome pathway distinct from the GGA protein-dependent pathway. *Mol Biol Cell.* 14:1319-1333.
- Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr.** 2011. The ESCRT pathway. *Dev Cell.* 21:77-91.
- Henne, W.M., H. Stenmark, and S.D. Emr.** 2013. Molecular mechanisms of the membrane sculpting ESCRT pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5.
- Herrador, A., S. Herranz, D. Lara, and O. Vincent.** 2010. Recruitment of the ESCRT machinery to a putative seven-transmembrane-domain receptor is mediated by an arrestin-related protein. *Mol Cell Biol.* 30:897-907.

- Hierro, A., A.L. Rojas, R. Rojas, N. Murthy, G. Effantin, A.V. Kajava, A.C. Steven, J.S. Bonifacino, and J.H. Hurley. 2007. Functional architecture of the retromer cargo-recognition complex. *Nature*. 449:1063-1067.
- Hirst, J., L.D. Barlow, G.C. Francisco, D.A. Sahlender, M.N. Seaman, J.B. Dacks, and M.S. Robinson. 2011. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol*. 9:e1001170.
- Howell, G.J., Z.G. Holloway, C. Cobbold, A.P. Monaco, and S. Ponnambalam. 2006. Cell biology of membrane trafficking in human disease. *Int Rev Cytol*. 252:1-69.
- Huranova, M., G. Muruganandam, M. Weiss, and A. Spang. 2016. Dynamic assembly of the exomer secretory vesicle cargo adaptor subunits. *EMBO Rep*. 17(2):202-19.
- Hurley, J.H. 2015. ESCRTs are everywhere. *EMBO J*. 34:2398-2407.
- Jimenez, C., C. Sacristan, M.I. Roncero, and C. Roncero. 2010. Amino acid divergence between the CHS domain contributes to the different intracellular behaviour of Family II fungal chitin synthases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol*. 47:1034-1043.
- Katzmann, D.J., S. Sarkar, T. Chu, A. Audhya, and S.D. Emr. 2004. Multivesicular body sorting: ubiquitin ligase Rsp5 is required for the modification and sorting of carboxypeptidase S. *Mol Biol Cell*. 15:468-480.
- Kim, Y., Y. Deng, and C.C. Philpott. 2007. GGA2- and ubiquitin-dependent trafficking of Arn1, the ferri-chrome transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 18:1790-1802.
- Kirchhausen, T., and S.C. Harrison. 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell*. 23:755-761.
- Klis, F.M., A. Boorsma, and P.W. De Groot. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 23:185-202.
- Kota, J., and P.O. Ljungdahl. 2005. Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol*. 168:79-88.
- Kozubowski, L., H. Panek, A. Rosenthal, A. Bloecher, D.J. DeMarini, and K. Tatchell. 2003. A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruit chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell*. 14:26-39.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lam, K.K., M. Davey, B. Sun, A.F. Roth, N.G. Davis, and E. Conibear. 2006. Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol*. 174:19-25.
- Lauwers, E., Z. Erpapazoglou, R. Haguenaer-Tsapis, and B. André. 2010. The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends Cell Biol*. 20:196-204.

BIBLIOGRAFÍA

- Leon, S., and R. Haguenauer-Tsapis.** 2009. Ubiquitin ligase adaptors: regulators of ubiquitylation and endocytosis of plasma membrane proteins. *Expe Cell Res.* 315:1574-1583.
- Lesage, G., J. Shapiro, C.A. Specht, A.M. Sdicu, P. Menard, S. Hussein, A.H. Tong, C. Boone, and H. Bussey.** 2005. An interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 6:8.
- Levin, D.E.** 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.* 189:1145-1175.
- Lewis, M.J., B.J. Nichols, C. Prescianotto-Baschong, H. Riezman, and H.R. Pelham.** 2000. Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell.* 11:23-38.
- Li, X., S.A. Gerber, A.D. Rudner, S.A. Beausoleil, W. Haas, J. Villen, J.E. Elias, and S.P. Gygi.** 2007. Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J Proteom Res.* 6:1190-1197.
- Li, Z., F.J. Vizeacoumar, S. Bahr, J. Li, J. Warringer, F.S. Vizeacoumar, R. Min, B. Vandersluis, J. Bellay, M. Devit, J.A. Fleming, A. Stephens, J. Haase, Z.Y. Lin, A. Baryshnikova, H. Lu, Z. Yan, K. Jin, S. Barker, A. Datti, G. Giaever, C. Nislow, C. Bulawa, C.L. Myers, M. Costanzo, A.C. Gingras, Z. Zhang, A. Blomberg, K. Bloom, B. Andrews, and C. Boone.** 2011. Systematic exploration of essential yeast gene function with temperature-sensitive mutants. *Nature biotechnol.* 29:361-367.
- Lilie, S.H., and S.S. Brown.** 1994. Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 125:825-842.
- Lin, C.H., J.A. MacGurn, T. Chu, C.J. Stefan, and S.D. Emr.** 2008. Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell.* 135:714-725.
- Liu, K., K. Surendhran, S.F. Nothwehr, and T.R. Graham.** 2008. P4-ATPase requirement for AP-1/clathrin function in protein transport from the trans-Golgi network and early endosomes. *Mol Biol Cell.* 19:3526-3535.
- Liu, T.T., T.S. Gomez, B.K. Sackey, D.D. Billadeau, and C.G. Burd.** 2012. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell.* 23:2505-2515.
- Liu, Y., S. Sitaraman, and A. Chang.** 2006. Multiple degradation pathways for misfolded mutants of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *J Biol Chem.* 281:31457-31466.
- MacDonald, C., N.J. Buchkovich, D.K. Stringer, S.D. Emr, and R.C. Piper.** 2012. Cargo ubiquitination is essential for multivesicular body intraluminal vesicle formation. *EMBO Rep.* 13:331-338.
- MacGurn, J.A., P.C. Hsu, and S.D. Emr.** 2012. Ubiquitin and membrane protein turnover: from cradle to grave. *Annu Rev Biochem.* 81:231-259.
- MacGurn, J.A., P.C. Hsu, M.B. Smolka, and S.D. Emr.** 2011. TORC1 regulates endocytosis via Npr1-mediated phosphoinhibition of a ubiquitin ligase adaptor. *Cell.* 147:1104-1117.

- Marcusson, E.G., B.F. Horazdovsky, J.L. Cereghino, E. Gharakhanian, and S.D. Emr.** 1994. The sorting receptor for yeast vacuolar carboxypeptidase Y is encoded by the VPS10 gene. *Cell*. 77:579-586.
- McGough, I.J., and P.J. Cullen.** 2011. Recent advances in retromer biology. *Traffic*. 12:963-971.
- McGough, I.J., and P.J. Cullen.** 2013. Clathrin is not required for SNX-BAR-retromer-mediated carrier formation. *J Cell Sci*. 126:45-52.
- Meissner, D., J. Odman-Naresh, I. Vogelpohl, and H. Merzendorfer.** 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.
- Morvan, J., J.O. de Craene, B. Rinaldi, V. Addis, C. Misslin, and S. Friant.** 2015. Btn3 regulates the endosomal sorting function of the yeast Ent3 epsin, an adaptor for SNARE proteins. *J Cell Sci*. 128:706-716.
- Mukadam, A.S., and M.N. Seaman.** 2015. Retromer-mediated endosomal protein sorting: The role of unstructured domains. *FEBS Lett*. 589:2620-2626.
- Nikko, E., and H.R. Pelham.** 2009. Arrestin-mediated endocytosis of yeast plasma membrane transporters. *Traffic*. 10:1856-1867.
- Nothwehr, S.F., S.A. Ha, and P. Bruinsma.** 2000. Sorting of yeast membrane proteins into an endosome-to-Golgi pathway involves direct interaction of their cytosolic domains with Vps35p. *J Cell Biol*. 151:297-310.
- O'Donnell, A.F., A. Apffel, R.G. Gardner, and M.S. Cyert.** 2010. Alpha-arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Mol Biol Cell*. 21:3552-3566.
- O'Donnell, A.F., L. Huang, J. Thorner, and M.S. Cyert.** 2013. A calcineurin-dependent switch controls the trafficking function of alpha-arrestin Aly1/Art6. *J Biol Chem*. 288:24063-24080.
- O'Donnell, A.F., R.R. McCartney, D.G. Chandrashekarappa, B.B. Zhang, J. Thorner, and M.C. Schmidt.** 2015. 2-Deoxyglucose impairs *Saccharomyces cerevisiae* growth by stimulating Snf1-regulated and alpha-arrestin-mediated trafficking of hexose transporters 1 and 3. *Mol Cell Biol*. 35:939-955.
- Odorizzi, G., C.R. Cowles, and S.D. Emr.** 1998. The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol*. 8:282-288.
- Ono, N., T. Yabe, M. Sudoh, T. Nakajima, T. Yamada-Okabe, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe.** 2000. The yeast Chs4p protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology*. 146:385-391.
- Ortiz, D., and P.J. Novick.** 2006. Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *Eur J Cell Biol* 85:107-116.

BIBLIOGRAFÍA

- Paczkowski, J.E., B.C. Richardson, and J.C. Fromme.** 2015. Cargo adaptors: structures illuminate mechanisms regulating vesicle biogenesis. *Trends Cell Biol.* 25:408-416.
- Paczkowski, J.E., B.C. Richardson, A.M. Strassner, and J.C. Fromme.** 2012. The exomer cargo adaptor structure reveals a novel GTPase-binding domain. *EMBO J.* 31:4191-4203.
- Parker, J.L., A.B. Bielen, I. Dikic, and H.D. Ulrich.** 2007. Contributions of ubiquitin- and PCNA-binding domains to the activity of Polymerase eta in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 35:881-889.
- Pelham, H.R.** 2002. Insights from yeast endosomes. *Curr Opin Cell Biol.* 14:454-462.
- Peñalva, M.A., J. Tilburn, E. Bignell, and H.N.J. Arst.** 2008. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol.* 16:291-300.
- Piper, R.C., A.A. Cooper, H. Yang, and T.H. Stevens.** 1995. VPS27 controls vacuolar and endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 131:603-617.
- Piper, R.C., I. Dikic, and G.L. Lukacs.** 2014. Ubiquitin-dependent sorting in endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6.
- Popoff, V., G.A. Mardones, S.K. Bai, V. Chambon, D. Tenza, P.V. Burgos, A. Shi, P. Benaroch, S. Urbe, C. Lamaze, B.D. Grant, G. Raposo, and L. Johannes.** 2009. Analysis of articulation between clathrin and retromer in retrograde sorting on early endosomes. *Traffic.* 10:1868-1880.
- Prosser, D.C., T.G. Drivas, L. Maldonado-Baez, and B. Wendland.** 2011. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol.* 195:657-671.
- Prosser, D.C., A.E. Pannunzio, J.L. Brodsky, J. Thorner, B. Wendland, and A.F. O'Donnell.** 2015. alpha-Arrestins participate in cargo selection for both clathrin-independent and clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Sci*128:4220-4234.
- Raiborg, C., and H. Stenmark.** 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458:445-452.
- Raymond, C.K., I. Howald-Stevenson, C.A. Vater, and T.H. Stevens.** 1992. Morphological classification of the yeast vacuolar protein sorting mutants: evidence for a prevacuolar compartment in class E vps mutants. *Mol Biol Cell.* 1992:1389-1402.
- Reyes, A., M. Sanz, A. Duran, and C. Roncero.** 2007. Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *J Cell Sci.* 120:1998-2009.
- Risinger, A.L., and C.A. Kaiser.** 2008. Different ubiquitin signals act at the Golgi and plasma membrane to direct GAP1 trafficking. *Mol Biol Cell.* 19:2962-2972.
- Risselada, H.J., and H. Grubmuller.** 2012. How SNARE molecules mediate membrane fusion: recent insights from molecular simulations. *Curr Opin Struct Biol.* 22:187-196.

- Ritz, A.M., M. Trautwein, F. Grassinger, and A. Spang.** 2014. The prion-like domain in the exomer-dependent cargo Pin2 serves as a trans-Golgi retention motif. *Cell Rep.* 10:249-260.
- Rockenbach, U., A.M. Ritz, C. Sacristan, C. Roncero, and A. Spang.** 2012. The complex interactions of Chs5p, the ChAPs, and the cargo Chs3p. *Mol Biol Cell.* 23:4404-44015.
- Roncero, C.** 2002. The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet.* 41:367-378.
- Roncero, C., and Y. Sanchez.** 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., F. Wisnton, and P. Hieter.** 1990. Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual. *Cold Spring Harbor laboratory press., Cold Spring Harbor, New York.*
- Rubio-Teixeira, M., and C.A. Kaiser.** 2006. Amino acids regulate retrieval of the yeast general amino Acid permease from the vacuolar targeting pathway. *Mol Biol Cell.* 17:3031-3050.
- Ruiz-Herrera, J., and B. Xoconostle-Cazares.** 1995. Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. *Arch Med Res.* 26:315-321.
- Russell, M.R., T. Shideler, D.P. Nickerson, M. West, and G. Odorizzi.** 2012. Class E compartments form in response to ESCRT dysfunction in yeast due to hyperactivity of the Vps21 Rab GTPase. *J Cell Sci.* 125:5208-5220.
- Sacristan, C., J. Manzano-Lopez, A. Reyes, A. Spang, M. Muniz, and C. Roncero.** 2013. Dimerization of the chitin synthase Chs3 is monitored at the Golgi and affects its endocytic recycling. *Mol Microbiol.* 90:252-266.
- Sacristan, C., A. Reyes, and C. Roncero.** 2012. Neck compartmentalization as the molecular basis for the different endocytic behaviour of Chs3 during budding or hyperpolarized growth in yeast cells. *Mol Microbiol.* 83:1124-1135.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular Cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor laboratory press., Cold Spring Harbor, New York.*
- Sanchatjate, S., and R. Schekman.** 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.
- Sanger, F., S. Nickeln, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:5463-5467.
- Santos, B., A. Duran, and M.H. Valdivieso.** 1997. *CHS5*, A gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 17:2485-2496.
- Santos, B., and M. Snyder.** 1997. Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol.* 136:95-110.

BIBLIOGRAFÍA

- Sanz, M., F. Castrejon, A. Duran, and C. Roncero.** 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.
- Sato, M., S. Dhut, and T. Toda.** 2005. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 22:582-591.
- Scott, P.M., P.S. Bilodeau, O. Zhdankina, S.C. Winistorfer, M.J. Hauglund, M.M. Allaman, W.R. Kearney, A.D. Robertson, A.L. Boman, and R.C. Piper.** 2004. GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol*. 6:252-259.
- Schorr, M., A. Then, S. Tahirovic, N. Hug, and P. Mayinger.** 2001. The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol*. 11:1421-1426.
- Seaman, M.N.** 2005. Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol*. 15:68-75.
- Seaman, M.N.** 2008. Endosome protein sorting: motifs and machinery. *Cell Mol Life Sci*. 65:2842-2858.
- Seaman, M.N.** 2012. The retromer complex - endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*. 125:4693-4702.
- Seaman, M.N., E.G. Marcusson, J.L. Cereghino, and S.D. Emr.** 1997. Endosome to Golgi retrieval of the vacuolar protein sorting receptor, Vps10p, requires the function of the *VPS29*, *VPS30*, and *VPS35* gene products. *J Cell Biol*. 137:79-92.
- Shi, Y., C.J. Stefan, S.M. Rue, D. Teis, and S.D. Emr.** 2011. Two novel WD40 domain-containing proteins, Ere1 and Ere2, function in the retromer-mediated endosomal recycling pathway. *Mol Biol Cell*. 22:4093-4107.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 122:19-27.
- Smits, G.J., H. van den Ende, and F.M. Klis.** 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology*. 147:781-784.
- Smolka, M.B., C.P. Albuquerque, S.H. Chen, and H. Zhou.** 2007. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:10364-10369.
- Spang, A.** 2009. On the fate of early endosomes. *Biol Chem*. 390:753-759.
- Spang, A.** 2015. The Road not Taken: Less Traveled Roads from the TGN to the Plasma Membrane. *Membranes*. 5:84-98.
- Starr, T.L., S. Pagant, C.W. Wang, and R. Schekman.** 2012. Sorting Signals That Mediate Traffic of Chitin Synthase III between the TGN/Endosomes and to the Plasma Membrane in Yeast. *PLoS One*. 7:e46386.

- Strochlic, T.I., B.C. Schmiedekamp, J. Lee, D.J. Katzmann, and C.G. Burd.** 2008. Opposing activities of the Snx3-retromer complex and ESCRT proteins mediate regulated cargo sorting at a common endosome. *Mol Biol Cell*. 19:4694-4706.
- Swaney, D.L., P. Beltrao, L. Starita, A. Guo, J. Rush, S. Fields, N.J. Krogan, and J. Villén.** 2013. Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods*. 10:676-682.
- Tagwerker, C., K. Flick, M. Cui, C. Guerrero, Y. Dou, B. Auer, P. Baldi, L. Huang, and P. Kaiser.** 2006. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics*. 5:737-748.
- Trautwein, M., C. Schindler, R. Gauss, J. Dengjel, E. Hartmann, and A. Spang.** 2006. Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J*. 25:943-954.
- Trilla, J.A., A. Duran, and C. Roncero.** 1999. Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 145:1153-1163.
- Ungewickell, E., and D. Branton.** 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature*. 289:420-422.
- Valdivia, R.H., D. Baggot, J.S. Chuang, and R. Schekman.** 2002. The yeast Clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell*. 2:283-294.
- Valdivia, R.H., and R. Schekman.** 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.
- Vida, T.A., and S.D. Emr.** 1995. A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol*. 128:779-792.
- Weinberg, J., and D.G. Drubin.** 2012. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast. *Trends Cell Biol*. 22:1-13.
- Weiskoff, A.M., and J.C. Fromme.** 2014. Distinct N-terminal regions of the exomer secretory vesicle cargo Chs3 regulate its trafficking itinerary. *Front Cell Dev Biol*. 2:47.
- Whitfield, S.T., H.E. Burston, B.D. Bean, N. Raghuram, L. Maldonado-Baez, M. Davey, B. Wendland, and E. Conibear.** 2015. The alternate AP-1 adaptor subunit Apm2 interacts with the Mil1 regulatory protein and confers differential cargo sorting. *Mol Biol Cell*. 27:588-98.
- Yeung, B.G., and G.S. Payne.** 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Zanolari, B., U. Rockenbauch, M. Trautwein, L. Clay, Y. Barral, and A. Spang.** 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.
- Zhao, Y., J.A. Macgurn, M. Liu, and S.D. Emr.** 2013. The ART-Rsp5 ubiquitin ligase network comprises a plasma membrane quality control system that protects yeast cells from proteotoxic stress. *Elife.* 2:e00459.
- Zhdankina, O., N.L. Strand, J.M. Redmond, and A.L. Boman.** 2001. Yeast GGA proteins interact with GTP-bound Arf and facilitate transport through the Golgi. *Yeast.* 18:1-18.
- Zhou, C., Y. Yang, and A.Y. Jong.** 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques.* 8:172-173.
- Ziman, M., J.S. Chuang, and R.W. Schekman.** 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.
- Ziman, M., J.S. Chuang, M. Tsung, S. Hamamoto, and R. Schekman.** 1998. Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 9:1565-1576.

