

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica
(USAL/CSIC)



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

TESIS DOCTORAL

**El papel de Chs4p en el reciclaje
endocítico de Chs3p y su implicación
en la síntesis de quitina**

**M^a Abigail Reyes Valerón
Salamanca, 2009**



DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



imb



INSTITUTO DE
MICROBIOLOGÍA BIOQUÍMICA

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

CERTIFICA

Que la licenciada **M^a Abigail Reyes Valerón** ha realizado el trabajo titulado "**El papel de Chs4p en el reciclaje endocítico de Chs3p y su implicación en la síntesis de quitina**" bajo mi dirección, en el Departamento de Microbiología y Genética/Instituto de Microbiología Bioquímica (IMB), formando parte del centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca a 19 de Enero de 2009.

Dr. César Roncero Maíllo



DEPARTAMENTO DE
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



imb



INSTITUTO DE
MICROBIOLOGÍA BIOQUÍMICA

D. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, CATEDRÁTICO de MICROBIOLOGÍA y DIRECTOR del DEPARTAMENTO de MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA de la UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA

Que la memoria titulada **“El papel de Chs4p en el reciclaje endocítico de Chs3p y su implicación en la síntesis de quitina”**, presentada por la licenciada **M^a Abigail Reyes Valerón** para optar al grado de **Doctor en Ciencias Biológicas**, ha sido realizada bajo la dirección del Dr. César Roncero Maíllo, en el Departamento de Microbiología y Genética/Instituto de Microbiología Bioquímica (IMB), formando parte del centro mixto de la Universidad de Salamanca y del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, expide el presente certificado en Salamanca a de Enero de 2009.

Dr. Ángel Domínguez Olavarri

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica
(USAL/CSIC)

**El papel de Chs4p en el reciclaje
endocítico de Chs3p y su implicación
en la síntesis de quitina**

Memoria presentada por M^a Abigail Reyes Valerón
para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Salamanca, Enero 2009

AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar, a César, por darme la oportunidad de conocer el mundo de la investigación de primera mano. He sido afortunada de estar bajo su dirección y contar con su apoyo a lo largo de todo el trabajo. Asimismo, deseo agradecerle su cercanía y disponibilidad en estos años.

A Charo, porque la mayoría del trabajo realizado en esta tesis ha pasado bajo sus hábiles manos. Estoy en deuda con ella por mostrarse siempre dispuesta a ayudar y su buen hacer en el laboratorio.

A la Dra. A. Spang y todo su grupo, en especial al Dr. M. Trautwein, no sólo por las cepas cedidas y todos los medios que pusieron a nuestro alcance, sino también por sus consejos científicos y colaboración desinteresada. También quería agradecerles la cálida acogida que me brindaron en su laboratorio y su trato cercano.

A todo el personal técnico y administrativo del departamento y del IMB; especialmente al servicio de secuenciación, y a Ángel Durán por preocuparse de que todo funcione correctamente. Gracias a todos ellos, el trabajo diario en el laboratorio es mucho más sencillo.

También quiero agradecer a los distintos grupos, tanto jefes como becarios, sus consejos, críticas e impresiones en los seminarios, así como su ayuda desinteresada en cuestiones experimentales. Asimismo, quiero agradecer al Dr. Carlos Vázquez de Aldana y a la Dra. Henar Valdivieso las cepas amablemente cedidas.

A todos mis compañeros de laboratorio 219-222, por todos los buenos ratos, las risas y por siempre estar dispuestos a echar una mano. A Patricia y Lorena porque es cuanto menos inquietante que después de haber vivido juntas y vernos cada día en el café, nuestra amistad haya ido creciendo más y más. Siempre echaré de menos los días del poder de tres. A Paco, no hay palabras que puedan expresar mi agradecimiento por su apoyo incondicional y comprensión. A todos mis amigos, (en especial a Isa) por estar a mi lado todo este tiempo y hacerme sentir como en casa.

Y por último, gracias a mi familia porque a ellos les debo todo lo que soy y por apoyarme en cada una de mis decisiones, haciendo que continúe siempre hacia delante.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALP	Fosfatasa alcalina (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
ASL	Enlace sensible al álcali (<i>Alkali-Sensitive Linkage</i>)
CPY	Carboxipeptidasa Y
CWP	Proteína de la Pared Celular (<i>cell wall protein</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EM	Espectrometría de masas
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>green fluorescent protein</i>)
GPI	Glucosil Fosfatidil Inositol
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
HA	Epítipo inmunoreactivo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe
Kb	Kilo base
KDa	Kilo Dalton
MP	Membrana plasmática
NAcGln	N-AcetilGlucosamina
PC	Pared celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
QS	Quitín Sintasa
RE	Reticulo endoplásmico
SDS	Dodecil sulfato sódico
TGN	Trans-Golgi Network (red tubular de distribución del trans-golgi)
SLR	Sel-1 Like Repeat (repeticiones de aa que constituyen un motivo estructural)
UDP	Uridina difosfato
WGA	Aglutinina de germen de trigo (<i>wheat germ agglutinin</i>)
WT	Tipo silvestre

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN 1

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. CICLO DE VIDA Y MORFOGÉNESIS	1
3. LA PARED CELULAR FÚNGICA.....	3
3.1 COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	4
3.2 ARQUITECTURA Y ENSAMBLAJE DE LA PARED CELULAR.....	4
3.3 BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS DE LA PARED CELULAR	6
3.3.1 β (1,3)-GLUCANO.....	6
3.3.2 β (1,6)-GLUCANO.....	6
3.3.3 QUITINA.....	7
3.3.4 MANOPROTEÍNAS	7
3.4 DINÁMICA Y REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR.....	8
4. LA QUITINA.....	9
4.1 LOCALIZACIÓN DE QUITINA.....	11
4.2 ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA I.....	13
4.2.1 FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSI.....	13
4.3 ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA II.....	14
4.3.1 FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSII.....	14
4.4 ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA III	16
4.4.1 FUNCIÓN Y REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII	17
4.5 DEGRADACIÓN DE QUITINA	17
5. REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD QSIII	18
5.1 Chs3p: SUBUNIDAD CATALÍTICA DE LA ACTIVIDAD QSIII.....	18
5.2 TRANSPORTE INTRACELULAR GENERAL	19
5.3 ENDOCITOSIS GENERAL	25
5.4 TRANSPORTE ESPECÍFICO DE Chs3p.....	28
5.5 ESPORULACIÓN.....	32
5.6 CONJUGACIÓN	33
5.7 INACTIVACIÓN Y RECICLAJE DE Chs3p	33

MATERIALES Y MÉTODOS 35

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.....	37
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	38
2.1 MEDIOS DE CULTIVOS PARA <i>E. coli</i>	38
2.2 CRECIMIENTO VEGETATIVO DE <i>S. cerevisiae</i>	38
2.3 CONDICIONES DE ESPORULACIÓN DE <i>S. cerevisiae</i>	39
2.4 TRATAMIENTO CON FACTOR α	39
2.5 MEDIOS SUPLEMENTADOS CON DROGAS	40
2. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	40
2.1. OBTENCIÓN DE ADN.....	40
2.2 TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS DEL ADN	40
2.3 ELECTROFORESIS DEL ADN EN GELES DE AGAROSA.....	41
2.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	41
2.5 SECUENCIACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	43

2.6 MUTAGÉNESIS DIRIGIDA <i>in vitro</i>	43
2.7 VECTORES UTILIZADOS.....	44
3. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS	46
3.1 MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES.....	46
3.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA	46
4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE QUITINA.....	49
5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA III.....	49
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	50
6.1 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS	50
6.2 SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA E INMUNODETECCIÓN	51
6.3 FRACCIONAMIENTOS SUBCELULARES	52
6.4 INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA	53
6.5 AISLAMIENTO DE MEMBRANAS RESISTENTES A DETERGENTE (LIPID-RAFTS)	54
6.6 AGREGACIÓN DE Chs3p	54
6.7 PURIFICACIÓN DE Chs3p.....	54
6.8 ENSAYO DE DOS HÍBRIDOS.....	56

OBJETIVOS

59

RESULTADOS

63

1. Chs4p ES NECESARIA PARA LA CORRECTA TRANSLOCACIÓN DE Chs3p EN LA MP	65
1.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS Chs3p Y Chs4p	65
1.1.1 LOCALIZACIÓN INTRACELULAR DE Chs3p Y Chs4p	65
1.1.2 TRANSPORTE INTRACELULAR DE Chs4p.....	67
1.1.3 DELECIÓN DE LA REGIÓN CARBOXILO TERMINAL DE Chs4p.....	68
1.1.4 MUTANTES PUNTUALES DE Chs4p.....	73
1.2 LA ASOCIACIÓN DE Chs3p A LA MP DEPENDE DE Chs4p	77
1.2.1 LOCALIZACIÓN DE Chs3p EN AUSENCIA DE Chs4p.....	77
1.2.2 Chs4p INDUCE LA ACTIVACIÓN DE LA QSIII MEDIANTE LA TRANSLOCACIÓN DE Chs3p EN LA MP.....	80
1.2.3 POSIBLE PARTICIPACIÓN DE Chs4p EN EL TRANSPORTE ANTERÓGRADO DE Chs3p	81
1.3 Chs4p ESTÁ INVOLUCRADA EN LA ESTABILIDAD DE Chs3p EN LA MP	83
1.3.1 BLOQUEO DE ENDOCITOSIS: MUTANTE <i>end4Δ</i>	84
1.3.2 BLOQUEO DE ENDOCITOSIS: LATRUNCULINA A.....	86
1.3.3 ASOCIACIÓN DE CHS3P A “LIPID RAFTS”	88
1.3.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS MUTANTES <i>end4Δ</i>	89
2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII EN CONJUGACIÓN.....	93
2.1 LOCALIZACIÓN DE QUITINA Y PROTEÍNAS DE LA MAQUINARIA DEL SEPTO	94
2.2 TRANSPORTE ANTERÓGRADO Y ENDOCITOSIS	95
2.3 TRANSPORTE POLARIZADO DE Chs3p Y Chs4p.....	96
2.4 BLOQUEO DE ENDOCITOSIS DURANTE LA CONJUGACIÓN.....	97
2.5 EN CONJUGACIÓN, LA QUITINA ES INDEPENDIENTE DE SEPTINAS.....	98
2.6 ASOCIACIÓN DE Chs3p A LIPID RAFTS EN CONJUGACIÓN.....	100
2.7 Chs4p- Δ 590 EN CONJUGACIÓN	102

3. POSIBLES MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE Chs3p	105
3.1 SECUENCIACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS	105
3.2 TOPOLOGÍA DE Chs3p.....	107
3.3 REGIONES DE Chs3p QUE INTERACCIONAN CON Chs4p	108
3.4 TRUNCACIONES EN EL EXTREMO N-TERMINAL DE Chs3p	109
3.5 ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN Y UBIQUITINACIÓN DE Chs3p	112

DISCUSIÓN 113

1. INTRODUCCIÓN.....	115
2. Chs4p ES NECESARIO PARA LA CORRECTA TRANSLOCACIÓN DE Chs3p EN LA MP.....	116
2.1 EL GRUPO PRENILO DE Chs4p NO ES ESENCIAL PARA SU FUNCIÓN	117
2.2 LA INTERACCIÓN ENTRE Chs3p/Chs4p PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE Chs3p LA MP Y LA ACTIVACIÓN DE LA QSIII.....	119
2.3 EL RECICLAJE ENDOCÍTICO ES UN ELEMENTO CLAVE EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII	120
3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII EN CONJUGACIÓN.....	125
3.1 ASOCIACIÓN DE Chs3p A LIPID RAFTS EN CONJUGACIÓN.....	128
4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE Chs3p	129

CONCLUSIONES 135

BIBLIOGRAFÍA 139

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es 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. El interés en este organismo no sólo radica en sus aplicaciones industriales, sino que desde hace décadas se ha erigido como un modelo biológico en los diferentes procesos celulares. Su uso tan extendido en la investigación se debe a una serie de características, tales como:

- Rápido crecimiento en medios de cultivos simples y facilidad en el aislamiento de mutantes.
- Fácil manipulación en el laboratorio y sin riesgos gracias a su ausencia de patogenicidad y estatus GRAS.
- Sistema sencillo y versátil para la transformación de DNA y manipulación genética.
- Fisiología celular muy conservada en eucariotas superiores.

A parte de estas ventajas, se conoce desde hace más de 10 años la secuencia completa de su pequeño genoma, lo que ha facilitado los estudios a gran escala de genómica, proteómica, etc... Además de los estudios masivos, se han desarrollado una gran cantidad de esfuerzos destinados a conocer la función de genes individuales, sin olvidar el papel que desempeñan dentro del contexto biológico de la levadura. Muchos de estos estudios han permitido la identificación de proteínas humanas implicadas en diversas patologías.

2. CICLO DE VIDA Y MORFOGÉNESIS

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un organismo unicelular eucariótico que se puede presentar como tres tipos celulares: células haploides de tipo sexual α , de tipo sexual a y células diploides a/α . Todos estos tipos celulares son estables y se pueden reproducir de forma asexual por gemación. Los ciclos mitóticos haploide y diploide son a grandes rasgos bastante similares, diferenciándose, sin embargo, en el patrón de gemación. Mientras que las células haploides presentan un patrón axial, es decir la nueva yema emerge adyacente a la anterior, las células diploides se dividen siguiendo un patrón bipolar, esto es, geman en el lado opuesto a la división anterior. Cuando la célula alcanza un determinado tamaño al final de la fase G1 del ciclo celular, se desencadena la gemación, que consiste en la emisión de una célula hija de menor tamaño que la célula madre (**Figura 1**). Hasta que ocurra el proceso de citoquinesis, momento en el que se separan la célula hija y la célula madre, el crecimiento estará restringido únicamente a la yema. En un primer momento el crecimiento es apical, esto es, polarizado hacia el punto de gemación, pero cuando la célula hija alcanza un determinado tamaño el crecimiento cambia a isotrópico. Una vez que la yema recibe un núcleo tras la mitosis se forma un septo que separa a la célula madre de la célula hija. Tras la degradación de una parte del

mismo se produce la separación física entre las dos células, quedando una cicatriz prominente en la célula madre. La célula hija es visiblemente de menor volumen que la célula madre y continúa su crecimiento hasta alcanzar el tamaño requerido para entrar en un nuevo proceso de división. Esto determina un retraso respecto al ciclo celular de la célula madre.

S. cerevisiae también se puede reproducir de forma sexual. Cuando dos células haploides de tipo sexual opuesto (α y a) se encuentran, se produce la fusión de ambas células dando lugar a una célula diploide. Este hecho requiere del proceso conocido como conjugación, que consiste en una serie de cambios fisiológicos destinados a favorecer la fusión de ambas células. La fase de conjugación comienza cuando las células de tipo sexual α responden a la feromona factor α (secretada por las células α) y viceversa. A continuación se produce una parada en la fase G1 del ciclo celular, la transcripción de genes específicos de conjugación y un crecimiento polarizado orientado hacia el compañero sexual, dando lugar a una forma celular característica denominada *shmoo*. Cuando dos *shmoos* de tipo sexual opuestos se fusionan, originan una célula diploide que se divide vegetativamente de forma estable (Bardwell, 2005).

En condiciones de estrés nutricional, las células diploides salen del ciclo mitótico y entran en un proceso estrictamente regulado: la esporulación. El primer evento consiste en una parada en G1 de la célula diploide, seguido de las divisiones meióticas, que finalizan con la formación de 4 ascosporas (dos de cada tipo sexual) envueltas por una estructura especializada denominada asca. La pared de las ascosporas es una estructura altamente especializada capaz de soportar duras condiciones medioambientales. Cuando el entorno es favorable se produce la

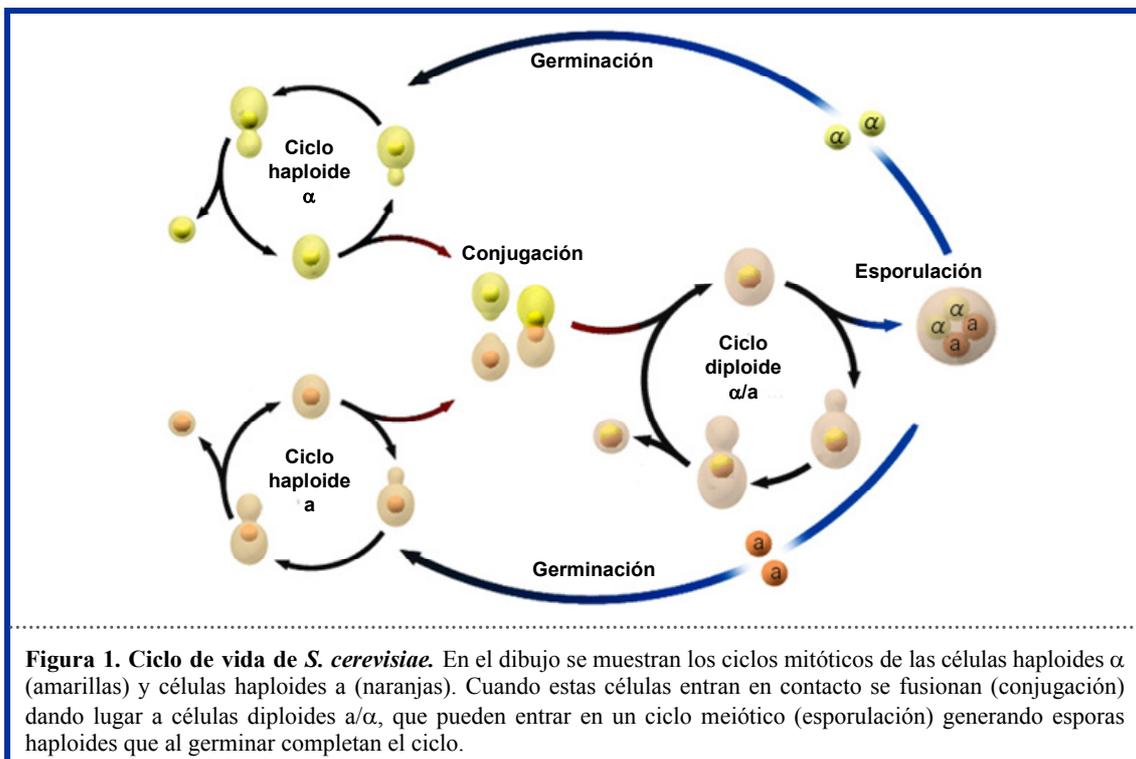


Figura 1. Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. En el dibujo se muestran los ciclos mitóticos de las células haploides α (amarillas) y células haploides a (naranjas). Cuando estas células entran en contacto se fusionan (conjugación) dando lugar a células diploides a/α , que pueden entrar en un ciclo meiótico (esporulación) generando esporas haploides que al germinar completan el ciclo.

germinación de las ascosporas, saliendo de un estado latente y entrando en un nuevo ciclo mitótico de células haploides (Neiman, 2005).

No hay que olvidar que las levaduras son organismos que responden al medio que las rodean, y son los nutrientes los que principalmente determinan su forma de crecimiento. Los medios de cultivo están compuestos por una fuente de carbono (glucosa) y por una fuente de nitrógeno (amonio), de tal forma que el crecimiento ocurre mediante el metabolismo fermentativo de la levadura. En condiciones óptimas, el crecimiento es vegetativo, es decir, mediante divisiones mitóticas que dan lugar a una célula hija genéticamente idéntica a la célula madre. Sin embargo, cuando se elimina uno de estos nutrientes se generan diferentes respuestas en el crecimiento; la falta progresiva de glucosa en el medio provoca una parada en G1 (fase estacionaria); por otra parte, la eliminación de la fuente de nitrógeno favorece un crecimiento filamentosos, que en el caso de *S. cerevisiae* es en forma de pseudohifa. El crecimiento pseudohifal, que ocurre solamente en determinadas cepas de *S. cerevisiae*, consiste en la formación de cadenas de células independientes capaces de invadir el medio sólido. Finalmente, la falta de ambos nutrientes desencadena la entrada en ciclo meiótico y esporulación, proceso característico de células diploides (Kron & Gow, 1995).

3. LA PARED CELULAR FÚNGICA

La pared celular (PC), una estructura que se localiza externa a la membrana plasmática (MP) y en contacto directo con el medio que le rodea, está presente en levaduras y hongos filamentosos. Es por tanto un elemento que ofrece protección osmótica y física a la célula, al mismo tiempo que se encarga de mantener su morfología.

A pesar de su aparente rigidez, la pared celular es una estructura muy plástica y dinámica que debe adaptarse a los continuos cambios morfológicos durante todo el ciclo celular. Del mismo modo, debe modificar su composición y estructura ante factores externos que puedan afectar a la integridad celular. Todo esto se consigue mediante un continuo equilibrio entre la síntesis y degradación de los polímeros que la constituyen.

Por todo lo anterior podemos resumir las funciones de la pared celular en cuatro aspectos principales: 1) Evitar la lisis osmótica, 2) Protección frente a daños mecánicos, 3) Mantener la forma celular, estrechamente ligada a la división celular y la morfogénesis y 4) Constituir el andamiaje necesario para el anclaje de proteínas de la pared celular, que participan en la permeabilidad de la pared celular, el reconocimiento célula-célula, procesos de agregación, etc... (Klis et al., 2006).

El interés en el estudio de la pared celular fúngica reside principalmente en dos cuestiones. Por un lado, sirve como modelo biológico para entender la síntesis y ensamblaje de una estructura tridimensional compleja. Y por otro, debido a que la pared celular es esencial para la viabilidad celular, está ampliamente distribuida en el grupo taxonómico de los hongos y

está ausente en células de mamíferos, constituye una atractiva diana en el desarrollo de nuevos antifúngicos de toxicidad selectiva.

3.1 Composición de la pared celular

La pared celular permite, tanto a plantas como a hongos, construir estructuras basadas en el uso de células a modo de ladrillos hidrostáticos. A pesar de utilizar la misma estrategia, la composición de la pared entre hongos y plantas es muy diferente. De hecho, esta estructura es muy variable dentro de los grupos taxonómicos de los hongos, tanto que llegó a utilizarse para la clasificación taxonómica de los mismos (Bartnicki-Garcia, 1968).

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* representa entre el 15 y el 30% del peso seco de la célula (Orlean, 1997) y ocupa entre un 25 y 50% del volumen celular. Los componentes fundamentales de la pared son polisacáridos (80-90% del peso seco) y glicoproteínas, en su mayoría manoproteínas. La pared celular está formada por 4 tipos de macromoléculas: $\beta(1,3)$ -glucano y $\beta(1,6)$ -glucano, que son polisacáridos formados por residuos de glucosa unidos principalmente por enlaces $\beta(1,3)$ y $\beta(1,6)$ respectivamente, la quitina, formada por residuos de N-AcetilGlucosamina y las manoproteínas o CWP (*cell wall proteins* = proteínas de la pared celular)

Las proporciones de los polímeros están indicadas en la **Tabla 1**, siendo el más abundante el $\beta(1,3)$ -glucano que le confiere una gran elasticidad a la pared celular.

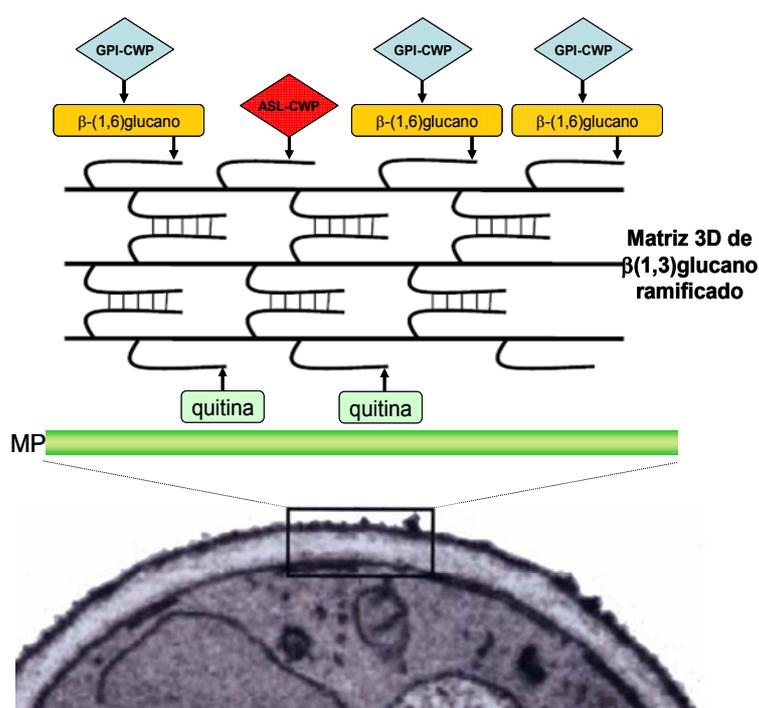
Tabla 1. Composición de la pared celular de *S. cerevisiae*.

Macromolécula	Peso seco de la pared (%)
Manoproteínas	50
$\beta(1,3)$ -glucano	40
$\beta(1,6)$ -glucano	5
Quitina	1-2

3.2 Arquitectura y ensamblaje de la pared celular

Al microscopio electrónico, la pared celular presenta dos capas: una capa interna menos densa a los electrones y de aspecto fibrilar, y otra externa, oscura y de aspecto amorfo (**Figura 2**). La capa interna, compuesta por los polisacáridos $\beta(1,3)$ -glucano y quitina, es la responsable de la elasticidad y rigidez propia de la pared celular. El $\beta(1,3)$ -glucano forma una red tridimensional que se mantiene unida entre sí por puentes de hidrógeno con las cadenas

Figura 2. Modelo molecular propuesto para la organización de la pared celular de *S. cerevisiae*. La capa interna constituye el esqueleto de la PC y está formada por un entramado de fibras de $\beta(1,3)$ -glucano ramificadas y unidas entre sí por puentes de hidrógeno. En los extremos no reductores (flechas) de las cadenas laterales del $\beta(1,3)$ -glucano se ancla el $\beta(1,6)$ -glucano hacia el exterior y las fibras de quitina hacia el interior, en la zona más próxima a la membrana plasmática (MP). Las CWP se unen covalentemente al $\beta(1,3)$ -glucano bien directamente a sus extremos reductores (ASL-CWP) o bien indirectamente a través de los extremos no reductores del $\beta(1,6)$ -glucano (GPI-CWP). Adaptado de (Smits et al., 2001).



laterales. A este entramado se unen covalentemente la quitina, hacia el interior y el $\beta(1,6)$ -glucano, hacia el exterior. El $\beta(1,6)$ -glucano actúa de intermediario en el anclaje de la capa externa, formada por las manoproteínas, a la capa interna de $\beta(1,3)$ -glucano. Además existen otras manoproteínas, las ASL-CWP que se anclan directamente al $\beta(1,3)$ -glucano (Klis et al., 2002; Lipke & Ovalle, 1998).

Aunque los componentes de la pared celular y las uniones entre ellos se han estudiado en detalle, poco se sabe sobre el orden de síntesis e incorporación de los polímeros en la pared. Se ha propuesto un modelo en el que el $\beta(1,3)$ -glucano sería el primero en sintetizarse, a continuación se le uniría el $\beta(1,6)$ -glucano y posteriormente se anclarían las manoproteínas. Finalmente, la quitina sería el último compuesto en añadirse al entramado de $\beta(1,3)$ -glucano (Roh et al., 2002b).

Asimismo, cabe destacar que la quitina se encuentra unida a diferentes polímeros dependiendo de su localización (Ver apartado 4.1). Así pues, la quitina localizada en el anillo está mayoritariamente unida al $\beta(1,3)$ -glucano, mientras que la presente en las paredes laterales se encuentra anclada al $\beta(1,6)$ -glucano. La quitina del septo primario, por su parte, se encuentra libre y sin interactuar con ningún polisacárido de la PC (Cabib et al., 2007; Cabib & Duran, 2005).

3.3 Biosíntesis de compuestos de la pared celular

A continuación se describe brevemente la estructura, biosíntesis y ensamblaje de cada uno de los componentes de la pared celular. Para una revisión más extensa se recomienda consultar los siguientes artículos: (Lipke & Ovalle, 1998), (Klis et al., 2002), (Lesage & Bussey, 2006), (Klis et al., 2006).

3.3.1 $\beta(1,3)$ -Glucano

El $\beta(1,3)$ -glucano es un polímero formado por residuos de D-glucosa unidos por enlace $\beta(1,3)$ con escasas ramificaciones de tipo $\beta(1,6)$. Esto da lugar a una compleja red tridimensional en la que se anclan el resto de componentes de la pared celular (Kollar et al., 1997). El $\beta(1,3)$ -glucano adopta mayoritariamente una conformación helicoidal, lo que explica la elasticidad y resistencia de la pared celular (Krainer et al., 1994).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen tres proteínas que constituyen las subunidades catalíticas de la actividad β -glucán sintasa: Fks1p, Fks2p y Fks3p. Mientras que Fks1p desempeña su función durante el ciclo vegetativo en medio rico (Mazur et al., 1995), Fks2p está más relacionada con condiciones de estrés nutricional o por daño en la pared (Zhao et al., 1998) y Fks3p está implicada en el proceso de esporulación (Ishihara et al., 2007). Por otra parte, la proteína GTPasa Rho1p está considerada la subunidad reguladora de la actividad β -glucán sintasa (Drgonova et al., 1996). Además de esta función, Rho1p también coordina multitud de procesos esenciales en la célula como son el mantenimiento de la polaridad, progresión en ciclo o señalización en la ruta de la integridad celular (Drgonova et al., 1999). Además existen otras enzimas, como por ejemplo la transglicosidasa Gas1p, implicadas en el procesamiento del $\beta(1,3)$ -glucano recién sintetizado (Popolo & Vai, 1999).

3.3.2 $\beta(1,6)$ -Glucano

Este polímero está formado por residuos de D-glucosa unidos por enlaces $\beta(1,6)$ con algunas ramificaciones en $\beta(1,3)$. Es una estructura amorfa con un papel fundamental en el ensamblaje, actuando como masa cementante entre las manoproteínas y el entramado de $\beta(1,3)$ -glucano y quitina (Kollar et al., 1997).

En *S. cerevisiae* se desconoce el mecanismo de síntesis de este polímero. Aunque se han encontrado varios genes que afectan a la síntesis de $\beta(1,6)$ -glucano, han sido de poca utilidad porque codifican proteínas que participan a lo largo de toda la ruta de secreción y muchas de ellas no están directamente implicadas en la síntesis del $\beta(1,6)$ -glucano (Shahinian & Bussey, 2000). Se han propuesto 2 hipótesis para la síntesis de este polímero: que se inicie en el Retículo Endoplásmico (RE) y vaya madurando a lo largo de la ruta de secreción o, por el contrario, que se sintetice en la MP (Klis et al., 2002). Además, se han descrito dos

transglucosidasas encargadas del procesamiento del $\beta(1,6)$ -glucano, Crh1p y Crh2p, responsables del anclaje de la quitina al $\beta(1,6)$ -glucano en las paredes laterales de la célula (Cabib et al., 2007; Cabib et al., 2008).

3.3.3 Quitina

La quitina es un polímero lineal de residuos de N-AcetilGlucosamina unidos mediante enlaces $\beta(1,4)$. 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 & Xoconostle-Cazares, 1995). Esta conformación, altamente insoluble, hace que la quitina sea la responsable de la rigidez de la pared celular. Aunque la quitina es el componente minoritario de la pared, es esencial para la supervivencia de esta levadura.

En la síntesis de quitina participan una serie de genes denominados chs (**ch**itin **syn**thesis) que están relacionados con tres actividades Quitín Sintasa. 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. Más adelante se ha dedicado una sección completa a la biosíntesis de este polímero.

3.3.4 Manoproteínas

Unidas a los polisacáridos se encuentran un variado grupo de manoproteínas, comúnmente denominadas CWPs (*cell wall proteins*), que colectivamente constituyen la capa más externa de la PC. Estas proteínas contienen un elevado contenido de carbohidratos, entre el 50 y el 90% del peso total de la molécula, y se pueden encontrar N-glicosiladas o bien, O-manosiladas (Klis et al., 2006; Orlean, 1997).

En función de su unión a los polisacáridos de la pared celular se pueden agrupar en: (1) GPI-CWPs son proteínas con una molécula de glucosil-fosfatidil-inositol (GPI), que tras perder su componente lipídico, se unen covalentemente al $\beta(1,6)$ -glucano y se orientan hacia el exterior de la pared (Kapteyn et al., 1996). (2) ASL-CWPs: es un pequeño grupo de proteínas que se unen directamente al $\beta(1,3)$ -glucano formando parte de la capa interna de la PC (De Groot et al., 2005).

Las funciones que desempeñan estas proteínas son muchas y muy variadas: confieren permeabilidad selectiva a la pared celular, intervienen en procesos de adhesión celular, remodelación de los polímeros, etc...La síntesis de las diferentes glicoproteínas de la PC está bien documentada, desde la formación de los oligosacáridos en el RE y su posterior anclaje a las proteínas, hasta su elongación en el aparato de Golgi (Orlean, 1997). Sin embargo, poco se conoce sobre los mecanismos y lugares de incorporación de estas moléculas a la pared celular.

3.4 Dinámica y remodelación de la pared celular

Se han estimado en torno a 1200 los genes que muestran algún fenotipo asociado con la pared celular. Esto nos da una idea de lo compleja y dinámica que es esta estructura. La pared celular debe modificar tanto su grosor como su composición en función de varios factores, que pueden ser externos, como la temperatura, el pH, los niveles de oxígeno, etc... o internos, al entrar en un determinado programa de desarrollo. A lo largo del ciclo de vida y ante determinados estímulos, podemos encontrar varios tipos celulares como son: la proyección sexual o *shmoo*, la pseudohifa y las ascosporas. Estas células especializadas, con morfologías muy variadas, están destinadas a cumplir un propósito que depende en gran medida de la capacidad de adaptación de la pared celular.

Por tanto, todas estas situaciones generan una serie de modificaciones en la pared celular que se van a exponer brevemente. Para una descripción más detallada se recomiendan los siguientes artículos de revisión: (Smits et al., 2001) (Lesage & Bussey, 2006) (Klis et al., 2006)

Durante el ciclo vegetativo, *S. cerevisiae* alterna un crecimiento polarizado (apical) seguido de uno no polarizado (isotrópico). El primero permite la emisión de la yema, mientras que el segundo garantiza el aumento de volumen de la misma. Lógicamente, el crecimiento apical depende de la secreción polarizada, ya que es necesario transportar las enzimas que sintetizan nuevo material de pared a los lugares de crecimiento activo. En último término todo depende de la correcta distribución del citoesqueleto de actina (Pruyne & Bretscher, 2000). Un claro ejemplo lo constituyen Fks1p y Rho1p, componentes de la β -glucán sintasa. Cuando el crecimiento es polarizado hacia la yema, ambas proteínas se localizan en ese extremo celular añadiendo nuevo $\beta(1,3)$ -glucano, y cuando el crecimiento cambia a isotrópico la localización de ambas proteínas deja de detectarse (Qadota et al., 1996). De esta forma se mantiene una distribución uniforme de β -glucano por toda la pared lateral. Sin embargo, la localización de la quitina no es homogénea, sino que se concentra mayoritariamente en la zona del septo de separación entre la célula madre y la hija. Por tanto, es evidente que su síntesis está regulada por el ciclo celular, restringiéndose a momentos y lugares concretos de la célula (Cabib et al., 1982). En el próximo capítulo se encuentra un análisis más detallado sobre la localización de la quitina durante el ciclo vegetativo.

Durante la fase de conjugación se produce una serie de cambios morfológicos destinados a la formación de la proyección sexual o *shmoo*. Este proceso va acompañado de profundos cambios en la estructura y composición de la pared celular, que dependen nuevamente del citoesqueleto de actina y la secreción polarizada. Durante esta etapa, el transporte intracelular se reorganiza orientándose hacia la punta de la proyección (Hasek et al., 1987). La conjugación requiere de tres proteínas específicas de pared celular, Sag1p, Aga1p y Aga2p, implicadas en funciones de adhesión celular (Revisado en Orlean, 1997). La síntesis de

quitina, por su parte, aumenta entre 3 y 4 veces, y se deposita de forma difusa en la base del *shmoo* (Roncero et al., 1988a).

Al entrar en el programa de esporulación, la pared celular se constituye de una forma muy diferente a la de las células vegetativas, ya que está diseñada para soportar las duras condiciones ambientales. La pared de las ascosporas está formada por cuatro capas: las dos capas internas están formadas principalmente por glucanos y manoproteínas en una composición similar a las células vegetativas. La siguiente capa está compuesta por quitosán, que es básicamente quitina desacetilada, lo que la hace resistente a las quitinasas. Finalmente, la capa más externa es de naturaleza proteica, constituida mayoritariamente por ditirosina, y anclada directamente a la capa de quitosán. (Revisado en Neiman, 2005). Uno de los aspectos más característicos de la pared de la ascospora es su uniformidad estructural, lo que indicaría la ausencia de mecanismos de polarización durante su formación.

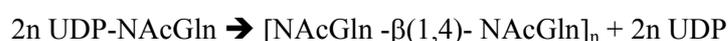
Asimismo, cuando la célula detecta algún tipo de daño en la pared celular se activa la ruta de integridad celular (PKC) (Extensamente revisado en Levin, 2005). Los estímulos que pueden activar esta ruta son tan diversos como el ataque por enzimas líticas, estrés hiposmótico y térmico o mutaciones que debilitan la pared. Las tres principales respuestas desencadenadas por esta ruta son:

1. Incremento de todos los componentes de la pared celular, como por ejemplo la quitina, que aumenta hasta alcanzar el 20% del peso seco de la pared.
2. Cambios en el mecanismo de ensamblaje de las proteínas a la pared celular y entre los propios polímeros que la constituyen.
3. Despolarización transitoria del citoesqueleto de actina que genera la redistribución de los complejos enzimáticos por toda la superficie celular.

4. LA QUITINA

El polisacárido de quitina es uno de los compuestos biológicos más abundantes en la naturaleza. Es un componente fundamental en el exoesqueleto de los artrópodos y puede ser considerado el equivalente a la celulosa del reino vegetal. La quitina forma parte de la pared celular de prácticamente todos los hongos, es esencial para la viabilidad celular y además, está ausente en organismos eucariotas superiores. Por todo ello, y debido al incremento y mortalidad de las infecciones fúngicas en estos últimos años, la quitina es una diana a tener en cuenta en el desarrollo de nuevos antifúngicos con toxicidad selectiva.

Las enzimas con actividad Quitín Sintasa (QS) catalizan la reacción siguiente usando la uridina-difosfo-N-AcetilGlucosamina (UDP-NAcGln) como sustrato:



Hasta el momento no se ha descrito la participación de un aceptor primario ni de intermediarios en esta reacción.

El sustrato UDP-NAcGln sólo se localiza en el citosol, sin embargo la quitina se encuentra en la parte externa de la célula, esto sugiere que la síntesis de quitina es un proceso vectorial. De hecho se ha descrito, que además de catalizar la reacción, las enzimas quitín sintasas tienen la capacidad de ir exportando el polímero al espacio periplásmico a través de la membrana plasmática (Orlean, 1997). Durante este proceso se asociarían las cadenas nascentes de (NAcGln)_n para formar el polímero cristalino de quitina.

En *S. cerevisiae* se han identificado tres actividades QS en extractos de membrana. Las diferencias bioquímicas entre las tres actividades facilita el análisis *in vitro* de cada una de ellas en presencia de las otras dos (ver más adelante).

Los genes codificantes de las subunidades catalíticas de las actividades QSI, QSII y QSIII son *CHS1*, *CHS2* y *CHS3* respectivamente, y codifican proteínas integrales de membrana con un perfil hidropático similar, entre 6 y 7 dominios transmembrana cada una (Silverman, 1989; Valdivieso et al., 1991).

Usando la proteína Chs2p como modelo, Nagahashi y colaboradores encontraron tres motivos conservados en todas las quitín sintasas descritas hasta ese momento. La secuencia consenso de estos motivos eran: QXXEY, EDRXL y QXRRW (Nagahashi et al., 1995), considerándose este último el dominio catalítico conservado a lo largo de toda la evolución. El alineamiento de 48 secuencias de quitín sintasas de varios hongos amplió ligeramente el tamaño de estas secuencias consenso y reveló que se incluían dentro de una región, con una estructura secundaria conservada, de aproximadamente 250 aminoácidos. Comparando las secuencias proteicas junto con la localización de los motivos conservados, las quitín sintasas se pueden clasificar en dos grandes familias (**Figura 3**). En la familia 1 los motivos conservados se encuentran aproximadamente en la mitad de la proteína, mientras que la familia 2 los presenta más próximos al extremo carboxilo-terminal (Ruiz-Herrera et al., 2002). Dentro de la familia 1 se encuentran las clases I y II, a las que pertenecen Chs1p y Chs2p respectivamente, y la clase III que es exclusiva de hongos filamentosos. La familia 2 comprende otras 3 clases: IV, V y VI. Chs3p se encuentra dentro de la Clase IV mientras que el resto de clases son exclusivas de hongos filamentosos. Si nos fijamos únicamente en los motivos conservados, Chs1p comparte un 58% de identidad con Chs2p, y ambas, alrededor del 30% con Chs3p (Lesage & Bussey, 2006). Estas diferencias no se restringen únicamente al grado de similitud, sino que abarca también aspectos funcionales de las proteínas (Roncero, 2002).

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

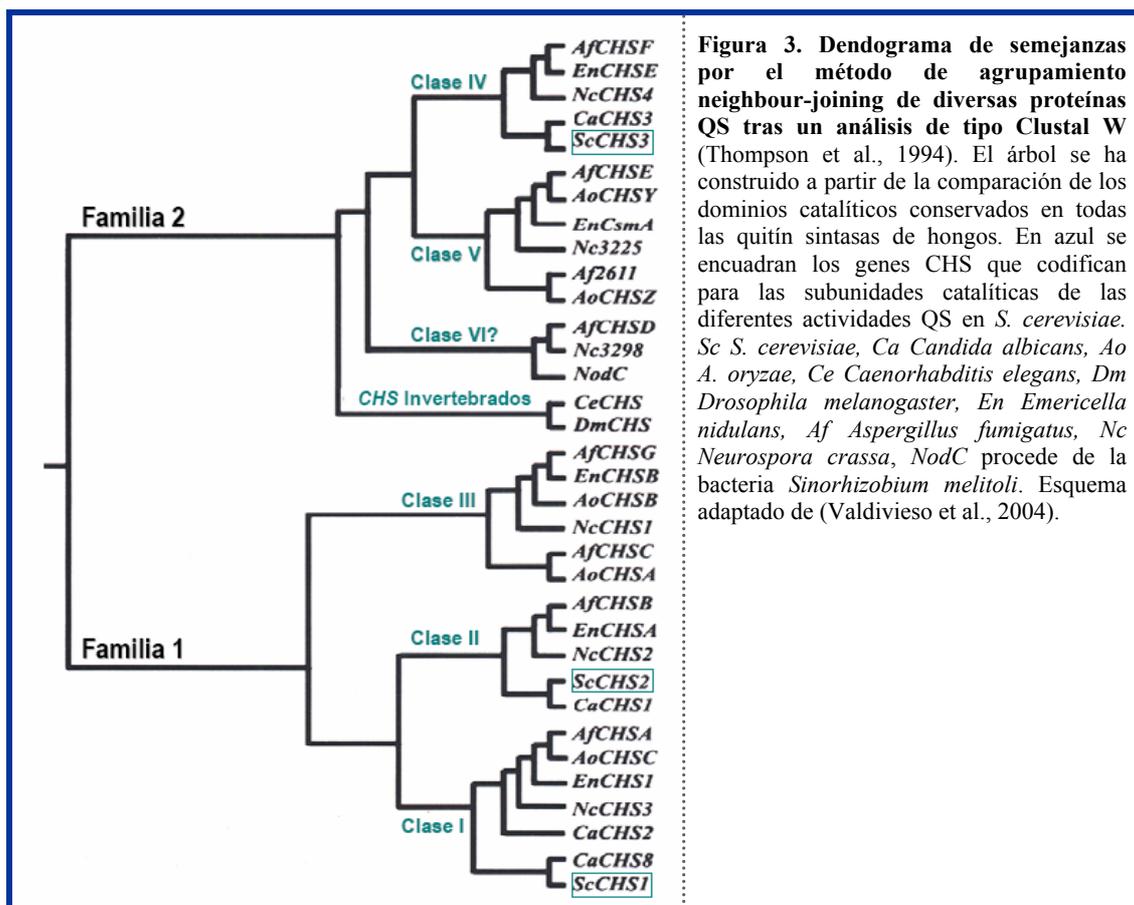


Figura 3. Dendrograma de semejanzas por el método de agrupamiento neighbour-joining de diversas proteínas QS tras un análisis de tipo Clustal W (Thompson et al., 1994). El árbol se ha construido a partir de la comparación de los dominios catalíticos conservados en todas las quitín sintasas de hongos. En azul se encuadran los genes CHS que codifican para las subunidades catalíticas de las diferentes actividades QS en *S. cerevisiae*. *Sc* *S. cerevisiae*, *Ca* *Candida albicans*, *Ao* *A. oryzae*, *Ce* *Caenorhabditis elegans*, *Dm* *Drosophila melanogaster*, *En* *Emericella nidulans*, *Af* *Aspergillus fumigatus*, *Nc* *Neurospora crassa*, *NodC* procede de la bacteria *Sinorhizobium melitoli*. Esquema adaptado de (Valdivieso et al., 2004).

4.1 Localización de quitina

En *S. cerevisiae*, la quitina constituye únicamente entre el 2-3% del peso seco de la pared celular, pero este porcentaje alcanza en torno al 20% en condiciones de estrés. En condiciones de crecimiento vegetativo, este polímero no se distribuye uniformemente sino que su síntesis está estrictamente regulada temporal y espacialmente durante el ciclo celular.

Al final de la fase G1, se deposita un anillo de quitina en el lugar donde va a emerger la yema. Este anillo, que concentra en torno al 90% de la quitina celular, permanecerá durante todo el proceso de gemación, y su misión es reforzar esa zona evitando un ensanchamiento del cuello (**Figura 4**) (Schmidt et al., 2002). Cuando la yema alcanza un tamaño determinado, se produce la mitosis y la segregación nuclear; es entonces cuando comienza otra síntesis de quitina. Esta nueva síntesis se inicia en la periferia del anillo y va progresando centrípetamente junto con la invaginación de la MP para acabar formando un disco de quitina denominado septo primario. Esta estructura separa físicamente a la célula madre de la célula hija. Posteriormente, se deposita a ambos lados nuevo material de pared para dar lugar al septo secundario, formando una estructura trilaminar visible al microscopio electrónico. El septo secundario presenta una composición similar al resto de la pared celular. Finalmente, es la quitinasa, junto con otras enzimas hidrolíticas secretadas desde la yema, las responsables de la separación celular. Esta separación asimétrica hace que prácticamente toda la quitina quede en

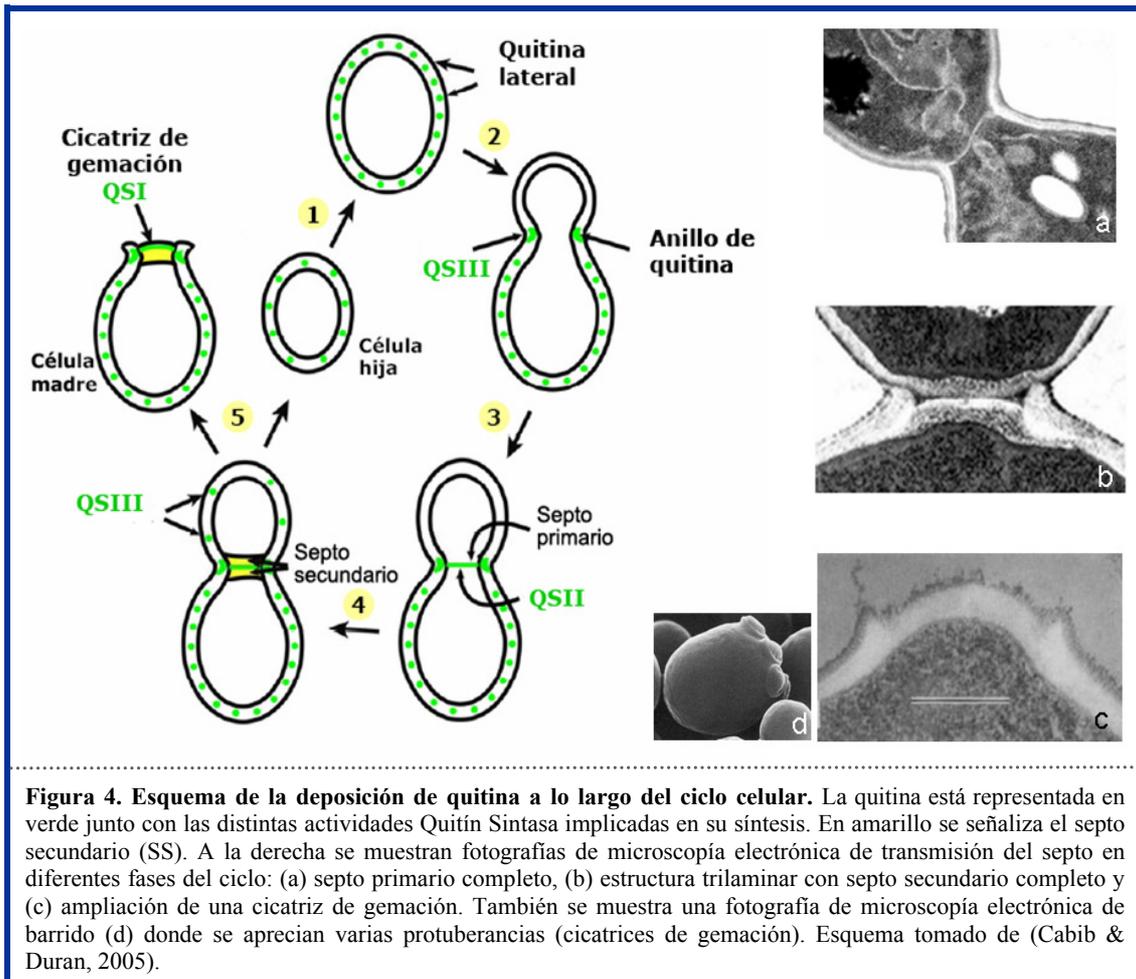


Figura 4. Esquema de la deposición de quitina a lo largo del ciclo celular. La quitina está representada en verde junto con las distintas actividades Quitín Sintasa implicadas en su síntesis. En amarillo se señala el septo secundario (SS). A la derecha se muestran fotografías de microscopía electrónica de transmisión del septo en diferentes fases del ciclo: (a) septo primario completo, (b) estructura trilaminar con septo secundario completo y (c) ampliación de una cicatriz de gemación. También se muestra una fotografía de microscopía electrónica de barrido (d) donde se aprecian varias protuberancias (cicatrices de gemación). Esquema tomado de (Cabib & Duran, 2005).

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

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

Por tanto, queda patente que la síntesis de quitina es un proceso complejo que debe estar finamente regulado ya que su acción está restringida a momentos y lugares concretos del ciclo celular. Esto queda reflejado en la existencia de tres actividades QS implicadas en distintos procesos dentro del ciclo de vida de *S. cerevisiae*, y además con mecanismos de regulación aparentemente específicos para cada una de ellas.

4.2 Actividad Quitín Sintasa I

La actividad QSI fue la primera descrita en la levadura *S. cerevisiae*. Su caracterización molecular comenzó en la década de los 80 con la identificación de mutantes afectados en la actividad QS *in vitro*. De esta forma se aisló el gen *CHS1*, que codifica la subunidad catalítica de la actividad Quitín Sintasa I.

La actividad QSI representa alrededor del 90% de la actividad total *in vitro*, pero paradójicamente su contribución a la cantidad de quitina *in vivo* es inapreciable (Bulawa et al., 1986). La actividad QSI es estrictamente zimogénica, es decir, su actividad óptima se consigue con un tratamiento previo con proteasas, sin embargo, nunca se ha demostrado que este tratamiento proteolítico suceda *in vivo*. El pH óptimo para medir esta actividad es de 6.5 con buffer MES (**Tabla 2**), se estimula en presencia de Mg^{2+} y el sustrato UDP-NAcetilglucosamina (NAcGln) y se inhibe por los cationes Co^{2+} y Ni^{2+} (Choi & Cabib, 1994), además de por otras drogas inhibidoras de todas las actividades QS como son la polioxina D y la Nikomicina (análogos estructurales de la UDP-NAcGln) (Cabib et al., 1996).

4.2.1 Función y regulación de la actividad QSI

El mutante afectado en el gen *CHS1* caracterizado por el grupo del doctor Cabib crecía normalmente y presentaba niveles de quitina similares a la cepa silvestre. Posteriormente, en un estudio más exhaustivo de la actividad QSI, se observó que el mutante *chs1Δ* en medios ácidos, presentaba un alto porcentaje de lisis en la yema (Cabib et al., 1989). La caracterización de este fenotipo estableció que la función de Chs1p consiste en contrarrestar la excesiva actividad de la quitinasas durante el proceso de citoquinesis. Esta función de reparación evita la lisis celular en condiciones de máxima expresión de las quitinasas, tal como ocurre en medios ácidos. (Bulawa, 1993; Valdivieso et al., 1999).

Tabla 2. Propiedades catalíticas de las actividades QS en extractos de membrana. Adaptado (Bulawa, 1993).

Actividad	Tripsina	pH	Activadores	Inhibidores
Quitín Sintasa I	Estimula	6.5	Mg^{2+} , NAcGln	Co^{2+} , Ni^{2+} , Polioxina D, Nikomicina
Quitín Sintasa II	Estimula	8	$Co^{2+} >$ Mg^{2+} , NAcGln	Ni^{2+} , Polioxina D
Quitín Sintasa III	Neutro	8	$Mg^{2+} >$ Co^{2+} , NAcGln	Polioxina D, Nikomicina

El gen *CHS1* tiene un pico máximo de expresión al inicio de la fase G1, coincidiendo con la citoquinesis. Sin embargo los niveles de la proteína Chs1p y la actividad se mantienen estables a lo largo del ciclo celular, por lo que todo parece indicar que la regulación de esta actividad es a nivel postraducciona (Choi et al., 1994a; Ziman et al., 1996). Chs1p, como el resto de subunidades catalíticas de las actividades QS, es una proteína integral de la membrana. Se localiza en dos compartimentos subcelulares: la MP y vesículas intracelulares. Estas vesículas, derivadas de endosomas tempranos y del Trans-Golgi Network (TGN), funcionan a modo de reservorio, y también se las conoce como quitosomas (Ziman et al., 1996). En el momento de la citoquinesis Chs1p es moviizada desde estas vesículas intracelulares hasta la zona del septo mediante un mecanismo de transporte desconocido e independiente del de Chs3p, también localizada en este tipo de vesículas (Ziman et al., 1998).

El promotor de *CHS1* presenta elementos de respuesta a feromonas y de hecho, este gen aumenta su expresión durante el proceso de conjugación (Appeltauer & Achstetter, 1989). De la misma forma, se detectan niveles altos de actividad QSI cuando se activa la ruta de integridad celular (Valdivieso et al., 2000). Sin embargo, se desconoce la relevancia fisiológica de la actividad QSI en ambos procesos, ya que el mutante *chs1Δ* no muestra ningún fenotipo en estas circunstancias (Bulawa et al., 1986; Santos et al., 1997).

4.3 Actividad Quitín Sintasa II

Debido a la viabilidad del mutante *chs1Δ* y de su escasa participación en la síntesis de quitina *in vivo*, se buscaron nuevos genes que codificaran para otra actividad QS. Este proyecto concluyó con la identificación del gen *CHS2*, subunidad catalítica de la actividad QSII (Sburlati & Cabib, 1986).

La actividad QSII supone aproximadamente un 10% de la QSI *in vitro*, y también es zimogénica. Al igual que ocurría con Chs1p no hay evidencias de que esto ocurra *in vivo*. La actividad QSII *in vitro* se estimula por la presencia del sustrato UDP-NAcetilGlucosamina y por Co^{2+} , que curiosamente es un inhibidor de la actividad QSI, además, la QSII presenta un pH óptimo más alcalino (pH 7.5-8) (**Tabla 2**). Aunque estos datos puedan resultar irrelevantes biológicamente, permiten distinguir estas dos actividades en una misma muestra. Una característica en común con Chs1p es que ambas son inhibidas por Ni^{2+} (Choi & Cabib, 1994).

4.3.1 Función y regulación de la actividad QSII

Inicialmente *CHS2* se describió como un gen esencial involucrado en la formación del septo y la división celular (Silverman et al., 1988). Sin embargo, trabajos posteriores determinaron que la viabilidad de las esporas *chs2Δ* dependía del fondo genético y del medio de crecimiento (Bulawa & Osmond, 1990). Las células del mutante *chs2Δ* tienen quitina pero presentan un fenotipo bastante llamativo: no se separan correctamente, forman pequeños

agregados y además, presentan un septo bastante difuso. Mediante tinciones específicas con WGA (lectina de germen de trigo que se une específicamente a la quitina) conjugada con oro coloidal, se determinó que Chs2p es la responsable de la síntesis de quitina del septo primario (Shaw et al., 1991). Su participación en la síntesis de quitina es minoritaria, ya que tan sólo es responsable del 10%. Sin embargo, es esencial para la correcta viabilidad celular.

Los niveles de mRNA de *CHS2* y de la proteína Chs2p fluctúan durante el ciclo celular (Choi et al., 1994a; Igual et al., 1996). Chs2p es sintetizada únicamente al final de mitosis y su actividad presenta un pico máximo justo antes de la citoquinesis. La proteína Chs2p es muy inestable y con una vida media muy corta, lo que sugiere que su regulación es mediante síntesis-degradación de la proteína (Chuang & Schekman, 1996). La expresión de *CHS2* está notablemente reducida en procesos de conjugación y esporulación, dos contextos en los que no se forma septo primario.

Todo indica que la regulación de la actividad QSII es el resultado de la combinación clásica de síntesis regulada transcripcionalmente unida a degradación proteolítica. El modelo actual para esta actividad propone que Chs2p es transportada a través de la ruta de secreción general hasta la MP del cuello, participando Sec1p en el último paso de este transporte (**Figura 5**). Una vez insertada en la MP, Chs2p sintetiza el septo primario y posteriormente se endocita en un proceso dependiente de la proteína End4p. Finalmente, es dirigida hacia la vacuola donde es degradada por la proteasa vacuolar Pep4p (Chuang & Schekman, 1996).

Además de Chs2p, el proceso de septación requiere la presencia de un anillo de actomiosina. Este anillo aporta la fuerza contráctil necesaria para la invaginación de la membrana y la síntesis centrípeta del septo primario. Asimismo, la contracción del anillo también depende de un septo primario funcional, esto hace que ambos procesos sean interdependientes (Schmidt et al., 2002). La localización, tanto de Chs2p como del anillo de actomiosina, depende del ensamblaje de

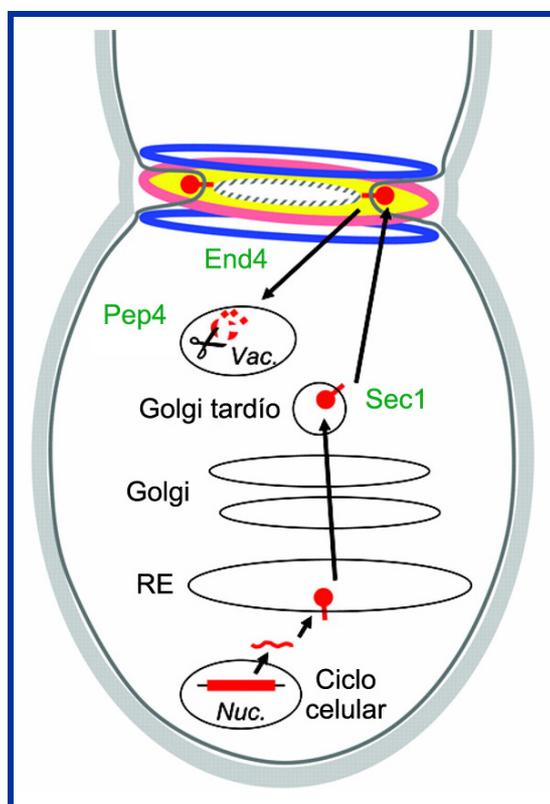


Figura 5. Regulación postraduccional de la actividad QSII. El gen *CHS2* y su producto se muestran en color rojo. En amarillo se representa la quitina sintetizada por Chs2p (septo primario) y en rosa el anillo de quitina sintetizado por Chs3p. Los anillos de septinas están dibujados en azul, la línea gris oscura representa la membrana plasmática, y la franja más externa de color gris claro, la pared celular. El anillo de actomiosina está representado mediante líneas discontinuas. En verde se destaca las proteínas implicadas en el tráfico de Chs2p. Vac. vacuola, Nuc. núcleo. Esquema adaptado de (Lesage & Bussey, 2006).

otro anillo formado por filamentos de septina. El anillo de septinas se sitúa en la base de la yema incipiente y sirve como andamiaje para el anclaje de otras proteínas. Al comienzo de la citoquinesis, el anillo de septinas se divide en dos, lo que ayuda a restringir la localización de Chs2p y a guiar la síntesis del septo primario en la zona central delimitada entre ellos. En mutantes de septinas la localización de Chs2p, así como de otros componentes del cuello, se ve alterada, lo que conlleva a una síntesis ectópica del septo (Roh et al., 2002a).

En conclusión, la actividad QSII está regulada temporalmente mediante la transcripción controlada por ciclo de *CHS2*, y espacialmente gracias al anillo de septinas.

4.4 Actividad Quitín sintasa III

Ya que los mutantes de *chs1Δ* y *chs2Δ* eran capaces de sintetizar la mayoría de la quitina *in vivo*, era evidente que tenía que existir una tercera actividad QSIII en la levadura *S. cerevisiae*. A finales de la década de los 80, se usaron dos aproximaciones independientes en la búsqueda de mutantes deficientes en la síntesis de quitina *in vivo*. Por un lado se seleccionaron mutantes resistentes al antifúngico calcoflúor (Roncero et al., 1988a), que es una droga que interacciona directamente con la quitina provocando la muerte celular (Roncero & Duran, 1985), y por otro, mutantes incapaces de incorporar glucosamina tritiada en quitina *in vivo* (Bulawa, 1992). En una tercera aproximación, también fueron aislados algunos mutantes con alteraciones en las capas de quitosán y ditirosina en las paredes de las ascosporas (Briza et al., 1990). A partir de los análisis de resistencia a calcoflúor se pudieron identificar varios genes implicados en la síntesis de quitina *in vivo*: *CHS3*, *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7* (Roncero, 2002). Posteriormente se determinó que *CHS3* era el gen que codificaba la subunidad catalítica de una actividad QS diferente y no descrita anteriormente: la actividad QSIII. Esta actividad, aunque minoritaria *in vitro*, sintetiza en torno al 90% de la quitina de la célula (Valdivieso et al., 1991). Si bien se ha demostrado que el resto de genes *CHS* son proteínas reguladoras, se sigue manteniendo la nomenclatura *CHS* original.

Chs3p muestra una homología limitada con las otras dos subunidades catalíticas Chs1p y Chs2p, pero contiene el motivo QRRRW que es característico de las QS y es esencial para su actividad catalítica (Cos et al., 1998). Tras la secuenciación completa del genoma de *S. cerevisiae* no se encontró ninguna actividad QS nueva.

Las diferencias en cuanto a secuencia de Chs3p y las otras dos subunidades catalíticas, Chs1p y Chs2p, también se hace extensible a las características de la actividad QS *in vitro*. La mayor diferencia radica en que la actividad QSIII se encuentra en la célula en una forma activa y no necesita un tratamiento con tripsina para su activación (Valdivieso et al., 1991). Aparte de la UDP-N-AcetilGlucosamina, los cationes Mg^{2+} y Co^{2+} estimulan la actividad QSIII. Sin embargo el Ni^{2+} , que es un inhibidor de Chs1p y Chs2p, apenas tiene efecto sobre Chs3p (Choi & Cabib, 1994), una propiedad muy útil si se quiere medir específicamente la actividad QSIII. El pH óptimo de esta actividad es 7,5-8 (**Tabla 2**). La actividad QSIII medida *in vitro*

representa aproximadamente un 5% respecto a la QSI, sin embargo es cuantitativamente la mayoritaria *in vivo* (Valdivieso et al., 1991).

4.4.1 Función y regulación de la actividad QSIII

El mutante *chs3Δ* es viable y muestra resistencia al antifúngico calcoflúor, una resistencia directamente relacionada con su baja cantidad de quitina, un 10% en comparación a la cepa silvestre. Sorprendentemente, los defectos morfológicos que presenta este mutante son mínimos.

La mayoría de la quitina sintetizada por Chs3p se localiza en forma de anillo en la zona de separación entre la célula madre y la célula hija, el resto consiste en una pequeña cantidad distribuida uniformemente por toda la pared lateral (Shaw et al., 1991). Asimismo, también es la responsable de la síntesis de quitina que se localiza en la base de la proyección del *shmoo* durante el proceso de conjugación y del quitosán, que es quitina desacetilada, presente en las paredes de las ascosporas (Valdivieso et al., 2004). Una de las respuestas de la ruta de integridad celular consiste en aumentar el contenido de quitina en la pared celular. Este incremento depende, precisamente, de la actividad QSIII (Popolo et al., 2001). Y finalmente, se ha descrito que cuando el aparato de septación se ve comprometido, como por ejemplo en el mutante *chs2Δ*, Chs3p es la encargada de sintetizar un septo de “remediación” funcional que permite a las células seguir dividiéndose (Cabib & Schmidt, 2003).

La regulación de la actividad QSIII es el eje principal de este trabajo, por lo que se le ha dedicado un capítulo completo más adelante.

4.5 Degradación de quitina

La pared celular es una estructura extremadamente dinámica que está sometida a constantes cambios. Esta elasticidad se mantiene mediante un continuo equilibrio entre la síntesis y degradación de los polímeros de la pared celular, entre ellos la quitina. La mayoría de las hidrolasas de la pared celular caracterizadas hasta la fecha presentan actividad quitinasa o glucanasa y algunas de ellas también muestran actividad transglicosidasa.

Se han descrito dos quitinasas en *S. cerevisiae*: Cts1p y Cts2p. Cts1p es una glicoproteína secretada al espacio periplásmico y se comporta como una endoquitinasa. La disrupción del gen *CTS1* muestra un fenotipo de células encadenadas, lo que llevó a la conclusión de que Cts1p está implicada en la degradación del septo al final de la citoquinesis (Kuranda & Robbins, 1991). Cts1p se expresa específicamente en la célula hija (Colman-Lerner et al., 2001) y esto provoca una separación asimétrica, dejando la mayoría de la quitina en el lado de la célula madre (cicatriz de gemación). La degradación excesiva por Cts1p es corregida por la quitín sintasa Chs1p (Cabib et al., 1996; Cabib et al., 1992). El segundo gen, *CTS2*, tiene una secuencia similar a las quitinasas y parece que su función es específica de esporulación (<http://www.yeastgenome.org>).

5. REGULACIÓN POSTRADUCCIONAL DE LA ACTIVIDAD QSIII

Como ya se ha mencionado, Chs3p es la responsable de la mayoría de la síntesis de quitina de la célula no sólo durante el proceso vegetativo sino también en las etapas de esporulación y conjugación. Y aunque el mutante *chs3Δ* es viable y aparentemente no presenta ningún fenotipo drástico, se ha visto que la quitina es esencial en la respuesta a daños en la PC, lo que se traduce en que estos mutantes sin quitina son hipersensibles a drogas que afectan a la PC. De la misma forma, se ha demostrado que Chs3p es esencial en otras muchas situaciones, y así el doble mutante *chs2Δ chs3Δ* se ha clasificado como sintético letal.

Estos resultados han llevado a postular un papel homeostático de la QSIII. Por tanto, no es de extrañar, que Chs3p presente una regulación postraducciona que le permita a la célula polarizar la síntesis de quitina durante los diferentes estadios del ciclo celular o responder rápidamente ante daños en la pared.

5.1 Chs3p: subunidad catalítica de la actividad QSIII

El gen *CHS3* codifica una proteína integral de membrana que muestra una homología significativa con Chs1p y Chs2p. La mayor divergencia de Chs3p comprende el extremo amino-terminal (N-terminal), que presenta dos posibles dominios transmembranales ausentes en las otras dos quitín sintasas. Estas diferencias en el extremo N-terminal se asociaron con una posible regulación específica de cada actividad. Sin embargo, la delección de este extremo en Chs1p y Chs2p no presentó ningún defecto en la actividad QS. (Ford et al., 1996). Por el contrario, delecciones en el extremo hidrofílico carboxi-terminal (C-terminal) de Chs3p, ausente en Chs1p y Chs2p, reduce drásticamente la actividad de la proteína (Cos et al., 1998). Es posible por tanto que esta región esté relacionada con la regulación específica de Chs3p (Lesage & Bussey, 2006).

Diferentes autores han demostrado que los niveles de Chs3p se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular, no sólo por la ausencia de una regulación postranscripcional, sino también porque la proteína presenta una vida media muy larga (Ziman et al., 1996). Estos resultados sugerían que Chs3p estaba sometida a regulación postraducciona, lo cual se confirmó al ver que la sobreexpresión de la proteína no aumentaba los niveles de quitina ni la actividad QSIII *in vitro* (Roncero, 2002; Valdivieso et al., 2004). El resto de genes *CHS* eran factores limitantes de esta actividad, ya que la sobreexpresión de algunos de ellos sí que producía un aumento de la actividad QSIII (Cabib et al., 1996).

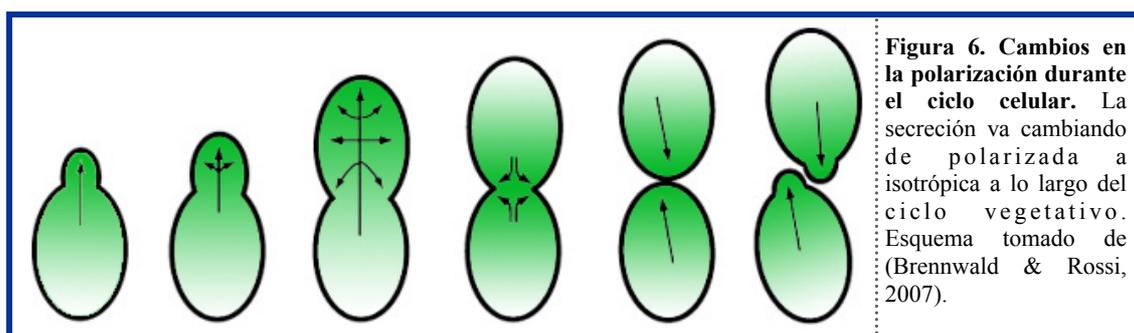
Chs3p es una proteína sintetizada en el RE que sufre diversas modificaciones postraduccionales, como glicosilación y palmitoilación, a medida que va madurando a su paso por los diferentes compartimentos celulares. La actividad QSIII tiene una serie de factores limitantes como son el resto de proteínas Chsp, cuya función es regular el transporte de Chs3p

hasta la MP. Algunas de estas proteínas son elementos comunes en la ruta de secreción general, pero en otros casos, su función sobre Chs3p es altamente específica (Valdivieso et al., 2004). Por tanto, cabe destacar que el transporte intracelular de Chs3p, coordinado e integrado dentro de la ruta de secreción general, es un elemento clave para la regulación de la actividad QSI. De esta forma, se consigue una síntesis de quitina espacial y temporalmente restringida, esencial para la viabilidad de la célula fúngica. La regulación postraduccional tan característica de Chs3p nos indica, no sólo la suma importancia que adquiere el transporte intracelular como mecanismo de control, sino también, la relevancia de la síntesis de quitina enmarcada dentro del contexto biológico de la levadura. Por todo ello, a continuación se va a introducir brevemente la ruta de secreción general para posteriormente centrarnos en la regulación específica de Chs3p.

5.2 Transporte intracelular general

Análisis genómicos y proteómicos han estimado que aproximadamente una tercera parte de todas las proteínas de *S. cerevisiae* son sintetizadas siguiendo la misma ruta de secreción general (Ghaemmaghami et al., 2003). Gran parte de los estudios se han realizado con proteínas solubles, sin embargo, éstas sólo representan una pequeña parte de la población total, ya que la mayoría de las proteínas secretadas son integrales de membrana y presentan diferencias significativas durante el transporte intracelular (Kaiser et al., 1997). A grandes rasgos, la ruta de secreción está bastante conservada desde levaduras hasta células animales.

Cuando la levadura comienza a gemar, necesita nueva aportación de membrana y proteínas en la zona de crecimiento, esto se consigue gracias al aporte constante y polarizado de la ruta de secreción general. La secreción de los componentes de membrana, además de polarizada, es muy dinámica, ya que varía a lo largo del ciclo celular (Lew & Reed, 1995). En yemas pequeñas la secreción se dirige hacia el extremo de la célula hija pero cuando la célula alcanza un tamaño determinado la secreción es isotrópica, orientándose hacia toda la superficie (**Figura 6**). A continuación, el nuevo material sintetizado se polariza hacia la zona de separación entre la célula madre y la célula hija, dando lugar a la septación y citoquinesis. En *S. cerevisiae* se han descrito muchos de los componentes implicados en secreción y polarización, sin embargo, no se conoce con detalle como se coordinan ambos procesos en la célula (Brennwald & Rossi, 2007).



El transporte de proteínas a través de la ruta de secreción general comienza en el Retículo Endoplásmico (RE). Las proteínas sintetizadas se translocan desde el citoplasma al interior del RE. Allí se pliegan y ensamblan con la ayuda de varias chaperonas y sufren diversas modificaciones postraduccionales. Una vez que han sido correctamente ensambladas y plegadas, las proteínas se exportan hacia el Golgi a través de las vesículas COPII. Tras la fusión de estas vesículas a la membrana del cis-Golgi, se cree que las proteínas son transportadas a través de los compartimentos sucesivos mediante nuevas rondas de formación y fusión de vesículas, aunque esta hipótesis aún no se ha demostrado experimentalmente. En su paso por el Golgi, las proteínas continúan con su maduración y cuando finaliza se cargan en determinadas vesículas dependiendo de cual sea su destino (Kaiser et al., 1997). Llegados a este punto, el transporte de las proteínas se ramifica y forma un entramado de varias rutas interconectadas entre sí. A grandes rasgos se pueden definir tres vías:

- Ruta de recuperación de proteínas de RE: transporte retrógrado de las proteínas que ejercen su función en el RE. El tipo de vesículas utilizadas se denomina COPI
- Proteínas residentes de vacuola que se transportan o bien directamente (Ruta APL) o a través de los endosomas (Ruta CPY)
- Rutas hacia la MP: Directas (exocitosis) o pasando por los endosomas.

Algunas proteínas integrales de membrana que han alcanzado la MP, son posteriormente introducidas al interior celular mediante endocitosis. En los casos más estudiados, la función de la endocitosis parece ser la regulación negativa de los receptores celulares y las permeasas de membrana.

A continuación se va a detallar el proceso de transporte intracelular, prestando especial atención a los últimos pasos de la secreción.

Retículo endoplásmico

Las proteínas pueden sintetizarse fuera del RE y luego ser translocadas hacia el interior del mismo, o bien, ser sintetizadas a la vez que se van introduciendo a través de la membrana del RE. En ambos casos es fundamental que la proteína se mantenga desplegada hasta su correcto plegamiento dentro del RE. Este proceso lo realizan las chaperonas, que son las encargadas de que las proteínas alcancen la correcta conformación final. Cuando las proteínas no se pliegan correctamente quedan acumuladas en el interior de RE, donde existen mecanismos de reciclado para las mismas (Ellgaard & Helenius, 2003). Además, la levadura posee la respuesta UPR (*unfolded protein response*), que se induce al acumularse por distintos motivos un exceso de proteína defectuosa (Zhang & Kaufman, 2006).

Además del plegamiento, el RE participa en otras modificaciones postraduccionales de las proteínas como la glicosilación. Además, algunas proteínas se sintetizan como precursores y tienen que procesarse proteolíticamente antes de exportarse, otras, forman parte de un

complejo proteico y necesitan ensamblarse en el RE, ya que como subunidades aisladas quedan retenidas en el RE (Rose & Doms, 1988). Las proteínas con anclajes GPI, como Gas1p, se modifican a su paso por el RE, lo que permite su salida del RE (Kaiser et al., 1997).

Las vesículas encargadas del transporte entre el RE y el Golgi son denominadas COPII. Este tipo de vesículas transporta una gran cantidad de proteínas con diferentes estructuras y funciones. Las proteínas transmembrana que van a ser secretadas por las COPII poseen una secuencia señal de reconocimiento expuesta hacia el citoplasma. En el caso de las proteínas solubles interviene una proteína receptora transmembrana (Barlowe, 2003). El reconocimiento no sólo se produce por su secuencia primaria, sino también por la conformación que adquiere tras el plegamiento correcto de la proteína. Las vesículas COPII se caracterizan por una serie de proteínas que las recubren denominadas coatómeros que inducen la curvatura de la membrana (**Figura 7**). El ensamblaje comienza con la activación de la pequeña GTPasa Sar1p, desencadenando el reclutamiento de otras proteínas encargadas, por un lado, del reconocimiento de las proteínas a transportar y por otro, de la formación de la cubierta externa de la vesícula (Sato & Nakano, 2007). La interacción de todo este complejo proteico induce la deformación de la membrana generando una yema que terminará escindiéndose y formando la vesícula COPII. Tras la escisión de la vesícula, se desensambla toda la cubierta gracias a la hidrólisis del GTP unido a Sar1p, y de esta forma quedan expuestas las proteínas de membrana implicadas en el reconocimiento de la vesícula.

El acoplamiento y fusión de la vesícula con su membrana de destino está regulado por una serie de proteínas citosólicas, denominadas genéricamente NSF (factor sensible a la N-etilmaleimida) y SNAP (proteína soluble unida a NSF). Las NSFs y las SNAPs intervienen en todos los procesos de fusión de vesículas a lo largo de toda la ruta de secreción. Los factores que aportan la especificidad a este proceso son los receptores de las proteínas SNAPs, denominados SNAREs, y se encuentran tanto en la vesícula (v-SNARE) como en la membrana de destino (t-SNARE). Este mecanismo de reconocimiento, altamente específico, está muy conservado durante toda la ruta secretoria y a lo largo de la evolución entre las células eucariotas (Teng et al., 2001).

Golgi

S.cerevisiae no presenta la típica morfología de Golgi en forma de cisternas apiladas característica de células de mamíferos. En la levadura, este orgánulo está mucho menos definido como se puede observar en fotografías al microscopio electrónico (Preuss et al., 1992). Sin embargo, las proteínas secretadas reciben modificaciones secuenciales que se pueden atribuir a tres compartimentos individuales, cada uno con una mezcla relativa de enzimas residentes de Golgi (Graham & Emr, 1991; Whitters et al., 1994).

El Golgi tiene dos funciones principales, por un lado modificar postraduccionalmente las proteínas mediante la adición de carbohidratos (Glicosilación) y por otro distribuir

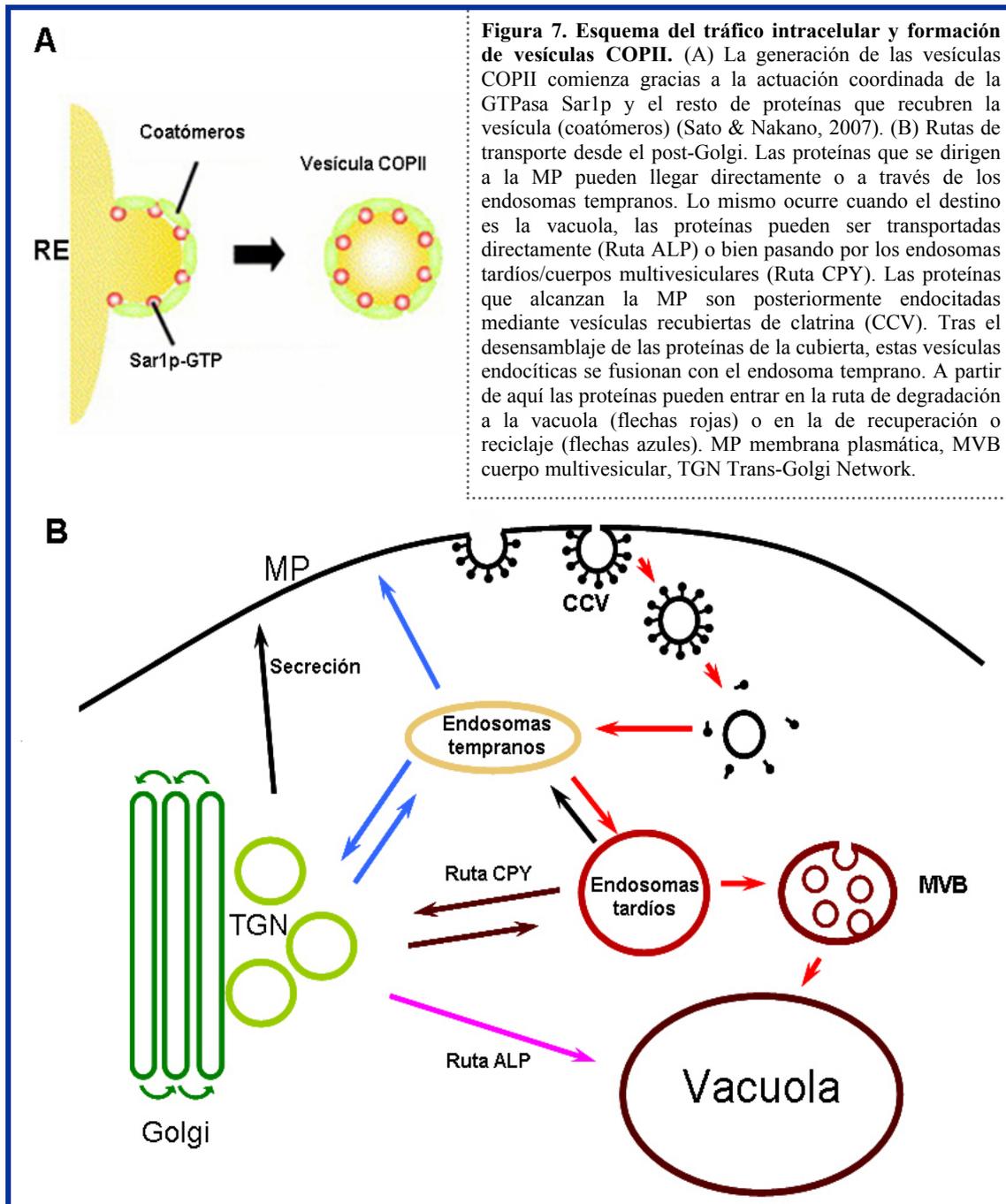


Figura 7. Esquema del tráfico intracelular y formación de vesículas COPII. (A) La generación de las vesículas COPII comienza gracias a la actuación coordinada de la GTPasa Sar1p y el resto de proteínas que recubren la vesícula (coatómeros) (Sato & Nakano, 2007). (B) Rutas de transporte desde el post-Golgi. Las proteínas que se dirigen a la MP pueden llegar directamente o a través de los endosomas tempranos. Lo mismo ocurre cuando el destino es la vacuola, las proteínas pueden ser transportadas directamente (Ruta ALP) o bien pasando por los endosomas tardíos/cuerpos multivesiculares (Ruta CPY). Las proteínas que alcanzan la MP son posteriormente endocitadas mediante vesículas recubiertas de clatrina (CCV). Tras el desensamblaje de las proteínas de la cubierta, estas vesículas endocíticas se fusionan con el endosoma temprano. A partir de aquí las proteínas pueden entrar en la ruta de degradación a la vacuola (flechas rojas) o en la de recuperación o reciclaje (flechas azules). MP membrana plasmática, MVB cuerpo multivesicular, TGN Trans-Golgi Network.

correctamente las proteínas para dirigir las a sus destinos finales. El Golgi está situado justo antes de la ramificación de varias rutas de secreción, por tanto, su misión consiste en clasificar las proteínas y cargarlas en las vesículas adecuadas.

Las vesículas COPII, procedentes del RE, se fusionan en la parte del cis-Golgi descargando su contenido de proteínas en la membrana y en el lumen del Golgi. Estas proteínas van sufriendo glicosilaciones sucesivas a medida que van pasando por los diferentes compartimentos. El paso entre uno y otro se cree que ocurre mediante la formación y fusión de

nuevas vesículas, denominadas COPI. Cuando las proteínas ya maduras alcanzan el trans-Golgi, se encapsulan en vesículas, que en conjunto forman un entramado denominado Trans-Golgi Network (TGN). A partir de aquí las proteínas siguen diferentes rutas formando una compleja red de secreción (**Figura 7**) que se puede resumir en:

1. Ruta de recuperación de proteínas del RE

Las proteínas que son residentes del RE tienen una secuencia específica de aminoácidos, HDEL y KKXX, que es reconocida por los coatómeros de las vesículas COPI, y transportadas de vuelta al RE (Kaiser et al., 1997).

2. Ruta CPY o AP-1

Esta ruta es la responsable del transporte de proteínas a la vacuola a través de derivados endosomales. Esta vía debe su nombre a su cargo más famoso: la proteína vacuolar carboxipeptidasa Y (CPY). Las vesículas que siguen esta ruta están recubiertas de clatrina y se denominan CCV (*clathrin/adaptor coated vesicles*), además contienen las proteínas adaptadoras Apl2p, Apl4p, Apm1p, Aps1p, que colectivamente forman el complejo AP-1 (Bowers & Stevens, 2005). La formación de estas vesículas, como todas las del tráfico intracelular, se inicia con la activación de una GTPasa, que en este caso es la proteína Arf1p. También existen otras proteínas adaptadoras de clatrina: Gga1p y Gga2p. Se ha descrito que estas proteínas adaptadoras facilitan el transporte de la permeasa general de aminoácidos Gap1p, en un estado ubiquitinado, desde el TGN hasta los endosomas (Scott et al., 2004).

3. Ruta ALP o AP-3

Esta es una ruta directa, que se dirige desde el Golgi hasta la vacuola, sin pasar por los endosomas. La proteína característica de esta ruta es la fosfatasa alcalina (ALP), aunque también se ha descrito otra proteína, Vam3p. Las vesículas implicadas en esta ruta necesitan el complejo adaptador AP-3, formado también por 4 subunidades: Apl6p, Apl5p, Apm3p y Aps3p. Contrariamente a lo que ocurre con el complejo AP-1, estas vesículas AP-3 no están recubiertas de clatrina (Cowles et al., 1997).

4. Ruta hacia la MP

La purificación y análisis de las vesículas acumuladas en mutantes de secreción bloqueados en el post-Golgi, determinaron que existen dos poblaciones con distinta carga y densidad (Harsay & Bretscher, 1995). Esto indica que en el transporte hacia la MP existen como mínimo dos rutas. Sin embargo, el número real de rutas así como las características de las mismas es muy difícil de determinar, ya que una proteína bloqueada en una vía puede ser redirigida hacia otra ruta alternativa y alcanzar la MP.

Una de las dos rutas descritas emplea los endosomas como intermediarios, al igual que en la Ruta CPY, y tras este paso la ruta se dirige hacia la MP. De hecho se ha descrito que en mutantes bloqueados en esta ruta común hacia los endosomas, la proteína CPY se redirige hacia la MP para posteriormente entrar en la vía endocítica y acabar finalmente en la vacuola donde ejerce su función (Harsay & Schekman, 2002). La otra ruta es directa, las proteínas alcanzan la MP desde el TGN sin pasar por intermediarios.

Todas estas rutas no son unidireccionales, sino que siempre existe otra antiparalela que permite el reciclaje de proteínas, como por ejemplo, de los receptores de cargo o las v-SNAREs. La secreción de proteínas es una función esencial para la célula y por ello se han desarrollado rutas alternativas que permiten la supervivencia celular en el caso de que una ruta esté seriamente dañada. Todo esto contribuye a que los últimos pasos de la secreción formen un complejo entramado de vías interconectadas.

5. Exocitosis

El mecanismo por el cual los nuevos componentes de membrana alcanzan la MP mediante la aproximación, acoplamiento y fusión de vesículas secretoras se conoce con el nombre de exocitosis. La levadura *S. cerevisiae* es un modelo particularmente atractivo en el estudio de la exocitosis, ya que muestra una acentuada secreción polarizada en respuesta a factores intra y extracelulares.

La exocitosis polarizada comprende tres pasos sucesivos: 1) llegada polarizada de las vesículas de secreción a través de los cables de actina, 2) acoplamiento de las vesículas con la MP y 3) fusión de las vesículas con la superficie.

Los mutantes afectados en los filamentos de actina acumulan vesículas secretorias del post-Golgi y están parcialmente bloqueados en la secreción de la proteína invertasa, lo que demuestra que la actina juega un papel fundamental en la exocitosis polarizada (Novick & Botstein, 1985). Los filamentos de actina se orientan hacia la yema en crecimiento y se pueden observar en forma de parches de actina. Parece que son la miosina de clase V, Myo2p, junto con las tropomiosinas, Tpm1p y Tpm2p, las que constituyen el motor que arrastra las vesículas de secreción a través de los cables de actina. (Finger & Novick, 1998).

Tras la aproximación a la MP, la vesícula se ancla a la superficie celular de forma específica. En este paso intervienen una serie de proteínas como son la GTPasa Sec4p y un complejo multiproteico denominado exocisto, que se localiza en la MP actuando como marcador de polaridad (TerBush et al., 1996). Se cree que en las fases iniciales del acoplamiento, Sec4p en su forma activa unida a GTP y anclada a la membrana de la vesícula interacciona con el complejo del exocisto localizado en la MP. La fusión de la vesícula con la MP depende del reconocimiento específico de las proteínas SNAREs. En el caso de la

vesícula se encuentra la v-SNAREs Snc1p (o su homólogo Snc2p) y, en la MP el complejo de dos t-SNAREs, Sec9p y Sso1p (o su homólogo Sso2p) (Sutton et al., 1998).

Las interacciones genéticas sugieren que estos dos últimos pasos de acoplamiento y fusión están estrechamente relacionados, y que la regulación de cada uno de ellos contribuye a la polarización de todo el proceso. Además hay que tener en cuenta que la secreción polarizada debe estar coordinada con otros eventos de la polarización celular como son la polarización del citoesqueleto de actina o la correcta localización de los marcadores de polaridad.

Las GTPasas de la familia Rho, que incluyen las proteínas Rho, Cdc42 y Rac, tienen un importante papel en los procesos de crecimiento polarizado. Se ha demostrado que dos de ellas, Rho3p y Cdc42p, regulan la secreción polarizada a través de la interacción y reclutamiento del exocisto hacia las zonas de crecimiento polarizado. En los alelos mutantes de *cdc42-6* y *rho3-V51*, afectados en polaridad, tanto el complejo del exocisto como los cables de actina se mantienen polarizados (Adamo et al., 2001; Roumanie et al., 2005). Esto ha permitido establecer que, no sólo es necesario el reclutamiento del exocisto hacia la zona de la MP, sino que para que realmente actúe como marcador de polaridad también necesita pasar a un estado activo. Es lo que se conoce como la teoría de la “Activación localizada”. El modelo expone que la interacción de las proteínas de la familia Rho con Exo70 provocaría un cambio estructural en la interacción proteína-proteína dentro del complejo del exocisto, y de esta manera pasaría de un estado basal a un estado activado, con la consiguiente polarización de las vesículas (Brennwald & Rossi, 2007).

5.3 Endocitosis general

La mayoría de las proteínas celulares que llegan a la MP no permanecen allí indefinidamente, sino que son nuevamente internalizadas mediante un proceso denominado genéricamente como endocitosis. Así pues, la endocitosis es un proceso que media no sólo la internalización de los componentes de la MP, sino también del material extracelular. La ruta endocítica está constituida por un complejo entramado cuya finalidad es la degradación de proteínas de membrana en la vacuola, o su reciclaje hacia el Golgi y a partir de ahí de nuevo a la MP. Es un proceso altamente regulado que depende de energía y de temperatura. La endocitosis afecta a la composición de lípidos y proteínas en la membrana plasmática y por tanto influye en la interacción entre la célula y el medio que le rodea.

En algunos casos las proteínas se endocitan de forma constitutiva, como en el caso de los receptores de feromonas Ste2p y Ste3p en ausencia de ligandos (Konopka et al., 1988) y del colorante fluorescente *lucifer yellow* (Riezman, 1985). Además existe otra endocitosis inducida, o bien por ligando, como en el caso del receptor Ste2p cuando se une al factor α , o bien por las condiciones ambientales, como ocurre con las aminoácidos permeasas de membrana (Kaiser et al., 1997).

La endocitosis mediada por vesículas recubiertas de clatrina es la principal ruta endocítica para la internalización de proteínas y lípidos de membrana (Engqvist-Goldstein & Drubin, 2003). La MP se invagina hasta formar vesículas denominadas CCV (*clathrin/adaptor coated vesicles*) que están recubiertas por clatrina y también por varias proteínas que forman el complejo multiproteico adaptador AP-2. Este complejo ayuda al ensamblaje externo de la clatrina y al reconocimiento de las moléculas cargo (Souza & Pichler, 2007).

La correcta organización del citoesqueleto de actina es fundamental para el proceso de la endocitosis. Los mutantes afectados en la organización de la actina no sólo presentan defectos más severos en endocitosis que los afectados en la clatrina, sino que las proteínas implicadas en la regulación dinámica de la actina son esenciales para este proceso. Se ha propuesto que tras la activación de los Factores Promotores de la Nucleación (NPFs), el complejo Arp2/3 induce la polimerización de la actina, lo que aporta la fuerza necesaria para invaginar la membrana hasta obtener la vesícula endocítica (**Figura 8**). Entre los NPFs endocíticos se incluyen: el homólogo en levaduras de WASP, Las17p, la proteína Pan1p, la proteína de unión a actina Abp1p y las miosinas no-convencionales de tipo I Myo2p y Myo3p. Tras el autoensamblaje de la clatrina llegan a la MP otros componentes de la cubierta endocítica tales como los adaptadores de clatrina y Pan1p, junto con el reclutamiento de Las17p. Todo este complejo forma una cubierta que produce la deformación de la MP, pero no es hasta que se une la miosina Myo5p en la zona apical de la estructura, justo antes de la llegada de Arp2/3 y que coincide con la polimerización activa de actina, cuando se produce una invaginación tubular mediante un movimiento lento. Parece que, aparte de la fuerza generada por la polimerización local de la actina, la actividad mecanoquímica de la miosina tipo I podría participar activamente en la deformación de la bicapa lipídica (Girao et al., 2008). Esta invaginación tubular, una vez elongada, queda recubierta en la base por una serie de componentes y en la zona del cuello por anfitisinas. Estas proteínas cooperan junto con dos estructuras de actomiosina para producir el estrangulamiento de esta estructura tubular lo que posteriormente provoca la escisión la vesícula endocítica (Idrissi et al., 2008). Finalmente, la cubierta de clatrina y el resto de proteínas se desensamblan y se dirigen nuevamente hacia la MP para ser reutilizadas. El tratamiento con Latrunculina A, una droga que secuestra los monómeros de actina, impide el movimiento lento de invaginación tubular (Kaksonen et al., 2003), lo que confirma que la polimerización de actina es esencial para elongar la incipiente invaginación de la MP.

En *S. cerevisiae* se pueden distinguir al menos tres compartimentos endocíticos: la vacuola y dos clases de endosomas (**Figura 7**). El endosoma temprano está estrechamente relacionado con el TGN y el endosoma tardío está más asociado a la ruta de degradación vacuolar. Este último compartimento va madurando mediante diversas invaginaciones de su membrana dando lugar a lo que se conoce como cuerpo multivesicular (MVB = *multivesicular body*). Las proteínas endocitadas pasan en primer lugar por el endosoma temprano. En este compartimento se decide el destino de las mismas que, o bien siguen la

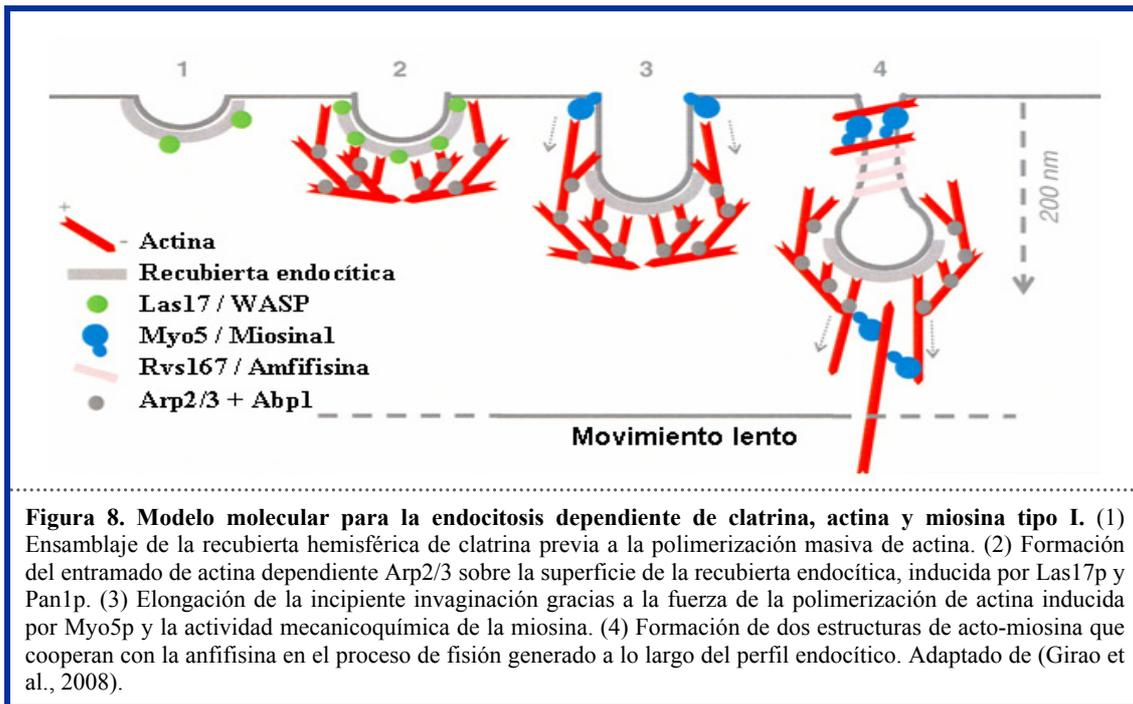


Figura 8. Modelo molecular para la endocitosis dependiente de clatrina, actina y miosina tipo I. (1) Ensamblaje de la recubierta hemisférica de clatrina previa a la polimerización masiva de actina. (2) Formación del entramado de actina dependiente Arp2/3 sobre la superficie de la recubierta endocítica, inducida por Las17p y Pan1p. (3) Elongación de la incipiente invaginación gracias a la fuerza de la polimerización de actina inducida por Myo5p y la actividad mecanicoquímica de la miosina. (4) Formación de dos estructuras de acto-miosina que cooperan con la anfifisina en el proceso de fisión generado a lo largo del perfil endocítico. Adaptado de (Girao et al., 2008).

ruta de degradación a través del endosoma tardío y que finaliza en la vacuola, o por el contrario, se reciclan hacia el TGN para ser secretadas nuevamente a la MP (Pelham, 2002).

Para que las proteínas sean transportadas correctamente entre los compartimentos, cada uno de ellos debe estar claramente identificado. Un factor importante en muchos casos es la presencia de las diferentes formas fosforiladas del fosfatidilinositol (PI) en su membrana. La ruta endocítica, incluyendo vacuolas, está señalizada con el PI-3 fosfato, mientras que las membranas de Golgi y la ruta hacia MP están asociadas a la presencia del PI-4 fosfato. El equilibrio de la presencia/ausencia de los PI en estas rutas se consigue mediante la actuación de determinadas quinasas y fosfatasas, y la alteración de la distribución de los PI provoca un cambio en el transporte de algunas proteínas (Pelham, 2002), como por ejemplo en Chs3p (Schorr et al., 2001). Los lípidos además de esta función, también juegan un importante papel en los primeros pasos de la internalización (Souza & Pichler, 2007).

Las proteínas que van a ser endocitadas necesitan una serie de señales que las diferencien de las proteínas estables de la MP. Aunque en mamíferos se han determinado unas secuencias peptídicas que actúan a modo de señales endocíticas, en levaduras no se ha visto ninguna secuencia que cumpla estas características (Kaiser et al., 1997). Sin embargo, muchas de las proteínas endocitadas son marcadas mediante ubiquitinación, que consiste en la unión de una o varias ubiquitinas a un residuo de lisina expuesto al citoplasma. La unión covalente de la ubiquitina en proteínas de membrana generalmente determina que las proteínas sean endocitadas para finalmente ser degradadas en la vacuola (Dupre et al., 2004). Recientes estudios sugieren que la ubiquitinación podría además intervenir en la

modificación de algunos componentes de la maquinaria endocítica así como en el transporte de proteínas a nivel de los endosomas tardíos o Golgi. La ubiquitinación es un proceso dinámico ya que las proteínas pueden ser mono o poliubiquitinadas, o incluso ser desubiquitinadas. Todo ello proporciona una herramienta muy versátil a la célula a la hora de controlar la estabilidad, función y localización intracelular de una gran variedad de proteínas (Horak, 2003).

Además, el estado conformacional de las proteínas de membrana también parece ser un elemento clave de regulación en su estabilidad en la MP (Arvan et al., 2002). Esto aboga por un mecanismo de control capaz de detectar el plegamiento erróneo de algunas proteínas en la MP, y redirigirlas, vía endocitosis, hacia la vacuola, donde son finalmente degradadas. Uno de los ejemplos más estudiados en la levadura lo constituye la ATPasa de MP, Pma1p, cuya función consiste en bombear protones al espacio extracelular, actividad esencial para la viabilidad celular. Se han descrito algunos mutantes de esta proteína que son capaces de alcanzar la MP en un estado conformacional alterado, lo que condiciona, que tras la inserción en la bicapa lipídica, sean rápidamente endocitados y degradados en la vacuola (Gong & Chang, 2001; Liu et al., 2006). El mecanismo de reconocimiento de proteínas mal plegadas en la MP es aún desconocido, sin embargo se sabe, que en algunos casos, estas proteínas mal plegadas son ubiquitinadas, induciendo su internalización y degradación (Liu & Chang, 2006; Pizzirusso & Chang, 2004). También se ha descrito que algunos de estos mutantes de Pma1p no son capaces de asociarse apropiadamente a los Lipid Rafts, que son microdominios de membrana ricos en ergosterol, implicados en una gran variedad de funciones celulares. Por lo que se ha postulado que la ausencia de asociación de los mutantes de Pma1p a estos dominios de membrana determina su inestabilidad en la MP (Bagnat et al., 2001).

5.4 Transporte específico de Chs3p

Chs3p es una proteína integral de membrana que está glicosilada (Cos et al., 1998), por lo tanto, debe transitar a lo largo de la ruta secretoria hasta llegar a la MP, de acuerdo con las ideas antes comentadas. Sin embargo, hoy sabemos, gracias a la caracterización de los genes *CHS* identificados a partir de fenotipo de resistencia a calcoflúor (Roncero et al., 1988a), que el transporte de Chs3p presenta unas características únicas (**Figura 9A**) como se verá a continuación.

CHS7

Este gen codifica para una proteína integral de membrana que se localiza en el RE y actúa como chaperona específica de Chs3p, promoviendo su salida del RE. En ausencia de Chs7p, Chs3p queda retenida en el RE y es inactiva tanto *in vitro* como *in vivo* (Trilla et al., 1999). Se cree que la función de Chs7p es similar a la de Shr3p, una chaperona específica de algunas aminoácido-permeasas de MP como Gap1p. Se ha demostrado que tanto Chs3p como

Gap1, en ausencia de sus respectivas chaperonas, forman agregados que dificultan su salida del RE. Se ha propuesto que una de las funciones de estas chaperonas es proteger las regiones hidrofóbicas de sus proteínas-sustrato evitando dicha agregación (Kota & Ljungdahl, 2005). Chs3p sufre palmitoilación a su paso por el RE. La unión de este grupo hidrofóbico sirve en general, para anclar las proteínas a la membrana, aunque en el caso de las proteínas integrales de membrana, como Chs3p, su función no está tan clara. La palmitoilación de Chs3p corre a cargo de Pfa4p, una acil-transferasa, que también es necesaria para evitar la agregación de Chs3p en RE. Tanto en el mutante *chs7Δ* como en el *pfa4Δ*, la palmitoilación de Chs3p está reducida, así pues, se ha propuesto que Chs7p y Pfa4p actúan de forma paralela y coordinada para garantizar la exportación de Chs3p del RE (Lam et al., 2006).

Chs7p está presente en la célula en cantidades limitantes. La sobreexpresión de Chs3p produce su acumulación en el RE y sólo se puede revertir aumentando también la cantidad de Chs7p intracelular. Esta sobreexpresión conjunta produce un incremento significativo de la actividad QSIII, lo que sugiere que la regulación transcripcional de Chs7p puede ser un importante mecanismo de regulación de la síntesis de quitina *in vivo*. De acuerdo con esto se ha visto un aumento de la expresión de *CHS7* en determinados procesos biológicos (Trilla et al., 1999).

CHS5 Y CHS6

En los mutante *chs5Δ* y *chs6Δ* no hay síntesis de quitina *in vivo*, y sólo se detecta algo de actividad QSIII *in vitro* en el mutante *chs6Δ* (Bulawa, 1993). Chs5p y Chs6p son proteínas asociadas al Golgi necesarias para el transporte de Chs3p hasta la MP. En ausencia de alguna de ellas Chs3p queda retenida en los quitosomas (Santos et al., 1997; Ziman et al., 1998). Recientemente se ha propuesto que ambas proteínas forman parte de un complejo multiproteico, denominado exómero, que recubre las vesículas que salen del TGN y que participa en el transporte de varias proteínas (Wang et al., 2006). Esto concuerda con el hecho de que Chs5p no sólo interviene en el transporte de Chs3p, sino también en el de otras proteínas de membrana como Fus1p.

Chs6p junto con sus parálogos Bch2p, Bch1p y Bud7 forma la familia CHAPs (Trautwein et al., 2006). Los mutantes simples de cada una de las CHAPs presenta un fenotipo determinado, por ejemplo, resistencia a calcoflúor en el caso del mutante *chs6Δ*, o un patrón aleatorio en la emisión de yema en el de *bud7Δ*. La delección conjunta de Bud7p y Bch1p, al igual que ocurre en el mutante *chs6Δ*, provoca la acumulación de Chs3p en las vesículas de Golgi con la consiguiente disminución de quitina, lo que sugiere que ambas proteínas tienen función redundante. Curiosamente, el mutante *chs5Δ* muestra todos los fenotipos de las CHAPs, esto apunta a que Chs5p es el elemento común a todas ellas. Chs5p es capaz de autoensamblarse y su ausencia provoca la deslocalización del resto de proteínas CHAPs (Sanchatjate & Schekman, 2006; Trautwein et al., 2006). Además se ha demostrado

que interacciona específicamente con la forma activa unida a GTP de la GTPasa Arf1p, una proteína involucrada en la formación de vesículas en el post-Golgi (Trautwein et al., 2006). Con todos estos datos se ha propuesto un modelo en el que Chs5p y las CHAPs forman un complejo, denominado exómero, que recubre las vesículas que salen del Golgi. Las CHAPs aportarían la especificidad de carga y Chs5p sería la pieza central del ensamblaje. Además de estas proteínas, deben intervenir otros factores, ya que este complejo por si solo no es capaz de deformar la membrana del Golgi para generar la vesícula (Wang et al., 2006).

Como ya se ha mencionado, Chs3p se puede localizar tanto en la MP como en reservorios intracelulares denominados quitosomas (Holthuis et al., 1998). El modelo *in vivo* indica que Chs3p es almacenada en estos quitosomas en una forma inactiva, y cuando se requiere es movilizadada desde ellos hasta la MP donde pasa a un estado enzimáticamente activo. Este reciclaje desde los quitosomas depende también de Chs5p y Chs6p (Ziman et al., 1998).

Cuando en los mutantes *chs5Δ* o *chs6Δ* se bloquea la recuperación desde los endosomas tempranos al TGN, se altera la retención de Chs3p en los quitosomas y ésta es transportada por una ruta alternativa hacia la MP. Por tanto, el requerimiento de Chs5p y Chs6p puede ser eludido en determinadas circunstancias y obtener una quitín sintasa III funcional, a través del redireccionamiento de Chs3p (Valdivia et al., 2002).

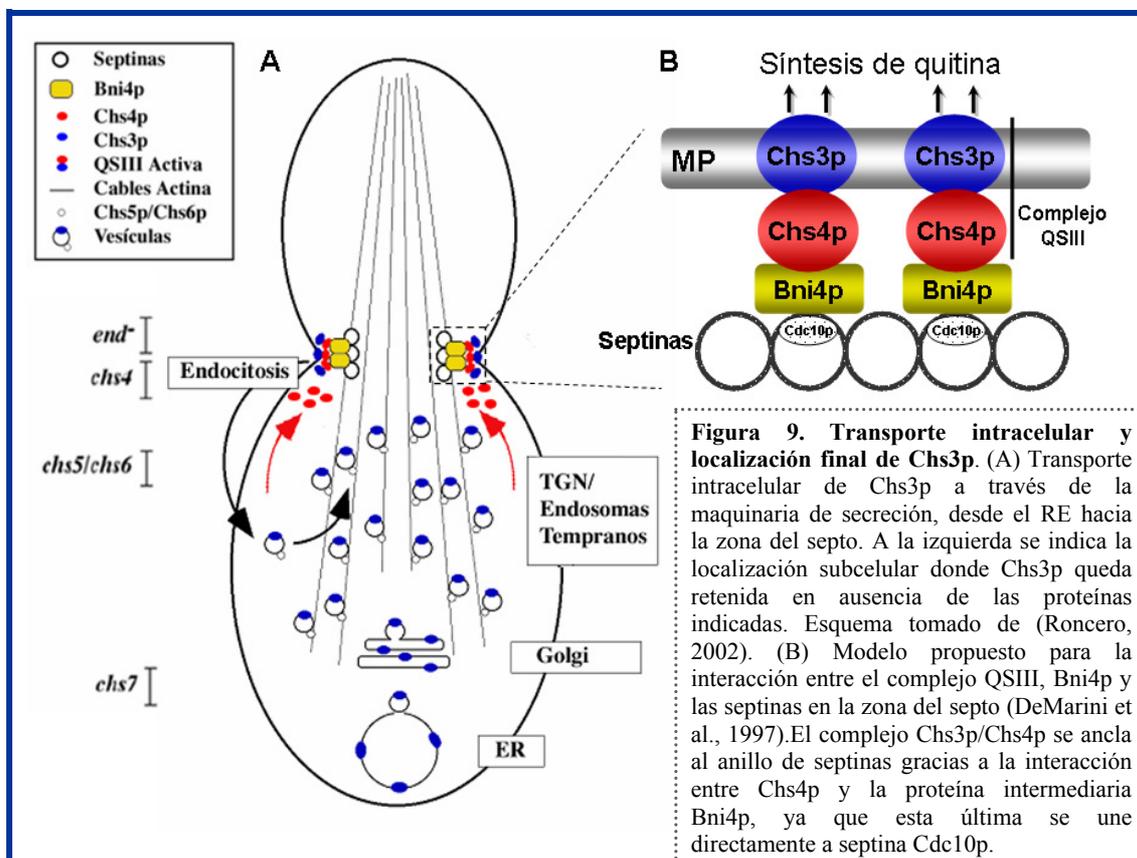
CHS4

Este gen se denominó originalmente *SKT5* y se relacionó con la síntesis de pared celular durante la regeneración de protoplastos (Kawamoto et al., 1992). El mutante original de *chs4Δ* se aisló como mutante resistente al antifúngico calcoflúor y se vio que era necesario para la síntesis de quitina y para la actividad QSIII *in vitro* (Bulawa, 1993; Roncero et al., 1988a). Sin embargo, análisis posteriores determinaron que la actividad QSIII en este mutante sí es funcional pero zimogénica (Choi et al., 1994b; Trilla et al., 1997). Chs3p y Chs4p parecen interactuar físicamente y la sobreexpresión de *CHS4* aumenta considerablemente la actividad QSIII *in vitro*. Todo esto induce a pensar que Chs4p podría actuar como activador de la actividad QSIII (Valdivieso et al., 2004) a través de su interacción directa con Chs3p (Ono et al., 2000). Sin embargo, nunca se ha comprobado que Chs4p tenga actividad proteolítica, no tiene homología con ninguna de las proteasas descritas en *S. cerevisiae* y no se ha demostrado que Chs3p sea procesada proteolíticamente *in vivo* (Cos et al., 1998; Santos et al., 1997). Todo esto sugiere que la naturaleza zimogénica de la actividad QSIII en el mutante *chs4Δ* es artefactual *in vitro*.

La función de Chs4p no sólo se limita a la activación de Chs3p, sino que además participa en la correcta localización de la misma a nivel del septo. El grupo de Dr. Pringle mediante ensayos de interacción de proteínas, propuso un modelo de anclaje de Chs3p a la

zona del cuello (**Figura 9B**) (DeMarini et al., 1997). Chs3p, inserta en la MP, interacciona con Chs4p y ésta a su vez con Bni4p, una proteína con funciones más generales en el ensamblaje de la maquinaria del septo (Kozubowski et al., 2003; Sanz et al., 2004). Bni4p actúa como intermediario, anclando Chs4p al anillo de septinas, específicamente a la septina Cdc10p. Este modelo encaja con los datos de que el mutante *bni4Δ* presenta niveles normales de quitina pero deslocalizada hacia la célula hija (DeMarini et al., 1997; Sanz et al., 2004). Aunque el papel de Chs4p en la localización y activación de Chs3p está claramente demostrado, el mecanismo molecular de activación se desconoce.

Chs4p contiene un dominio de prenilación en el extremo carboxi-terminal de la proteína y durante el desarrollo de este trabajo se demostró que a esta proteína se une un grupo farnesilo *in vivo* (Grabinska et al., 2007). Con respecto a la función del grupo prenilo hay cierta controversia. Algunos autores proponen que está directamente relacionado con la activación de Chs3p (Grabinska et al., 2007), aunque otros grupos han demostrado que el dominio de prenilación es totalmente prescindible, ya que no afecta ni a la cantidad ni a la distribución de quitina. (DeMarini et al., 1997; Ono et al., 2000; Trilla et al., 1997). Chs4p contiene 7 repeticiones SLR (Sel-1 Like Repeat), que consiste en repeticiones de entre 36 y 44 aminoácidos que adquieren una conformación en α -hélices característica. Las proteínas con estos dominios parecen cumplir una función adaptadora en el ensamblaje de complejos multiproteicos (Mittl & Schneider-Brachert, 2007). A parte de esto Chs4p no contiene ningún otro dominio consenso ni presenta homología con otras proteínas salvo con Shc1p, que es el



activador específico de Chs3p en esporulación. (Ver más adelante). Desde un punto de vista conceptual se ha venido asumiendo que Chs4p es el último eslabón en la ruta del transporte anterógrado de Chs3p.

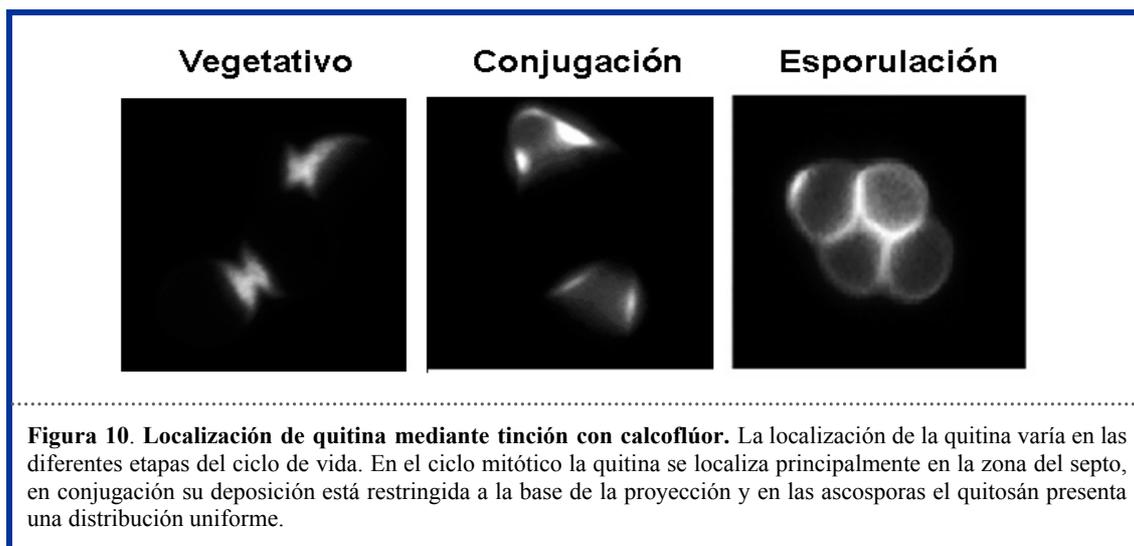
También se ha descrito que otros genes implicados en la secreción general de proteínas afectan a la localización de Chs3p. Por ejemplo, la sobreexpresión de Ypt32p o la delección de Sac1p, ambas implicadas en los últimos pasos del transporte, aumentan la llegada de Chs3p a la MP (Ortiz & Novick, 2006; Schorr et al., 2001). Asimismo, la activación de la ruta PKC parece tener un efecto directo en el transporte de Chs3p, provocando su movilización desde los quitosomas hacia la MP (Valdivia & Schekman, 2003).

5.5 Esporulación

La actividad QSIII es también la responsable de la síntesis de quitosán, quitina desacetilada, durante el proceso de esporulación. En este estadio no aumentan los niveles de proteína de Chs3p (Cos et al., 1998) y el quitosán se distribuye uniformemente por toda la PC de la ascospora (**Figura 10**). La actividad QSIII en este proceso depende de Chs7p, para su salida del RE (Trilla et al., 1999) y de Chs6p, sin embargo es independiente de Chs5p y Chs4p.

El dato de que Chs4p es prescindible durante la esporulación, se explica por la existencia de una proteína homóloga que se induce específicamente durante este proceso: Shc1p (Sanz et al., 2002). En el mutante *chs4Δ*, las paredes de las ascosporas son idénticas a las de una cepa silvestre, sin embargo, en *shc1Δ* la PC carece de la capa de quitosán, lo que origina esporas inmaduras similares a las del mutante *chs3Δ*. Se ha demostrado que aunque el mRNA de *CHS4* se sigue transcribiendo, Chs4p se degrada rápidamente durante el proceso de esporulación. Shc1p no se expresa en vegetativo, pero bajo un promotor inducible es capaz de restaurar la síntesis de quitina en el mutante *chs4Δ*. Curiosamente la distribución de esta quitina es uniforme por toda la PC, lo que sugiere que Shc1p es capaz de activar Chs3p pero no de anclarla correctamente en la zona del cuello. Este resultado es bastante lógico si tenemos en cuenta que durante el proceso de esporulación la quitina desacetilada se distribuye uniformemente y no existe anillo de septinas que determine su posición. Todos estos datos indican que Shc1p es un homólogo funcional de Chs4p específico de esporulación. El análisis comparativo de las dos proteínas, Chs4p y Shc1p, sugiere que la ausencia de 3 de los 7 dominios SLR en Shc1p podría estar asociada a la función de localización de Chs3p mediante su interacción con Bni4p (Sanz et al., 2002).

Por tanto, ha quedado establecido que la QSIII posee un mecanismo específico de regulación postraduccional durante el proceso de esporulación.



5.6 Conjugación

La cantidad de quitina aumenta hasta 3 veces durante el proceso de conjugación, lo cual coincide con un fuerte incremento de los niveles de Chs3p y Chs7p (Cos et al., 1998; Trilla et al., 1999). En este caso la función de la quitina es decisiva, ya que los mutantes afectados en su síntesis presentan una baja eficiencia de conjugación (Santos et al., 1997; Trilla et al., 1997; Trilla et al., 1999). Chs3p se localiza de forma polarizada por la periferia de la proyección sexual (Santos & Snyder, 1997), sin embargo, la distribución de quitina está restringida a la base del *shmoo* (Figura 10). Esta localización coincide con las septinas, que se disponen en barras paralelas en la base de la proyección (Ford & Pringle, 1991; Kim et al., 1991). Esta colocalización podría indicar que el complejo QSIII se ancla a las septinas tal y como ocurre en vegetativo, aunque esta hipótesis todavía no se ha demostrado.

Chs4p, Chs5p y Chs7p son esenciales para la síntesis de quitina durante este proceso sin embargo, el mutante *chs6Δ* no presenta ningún fenotipo (Valdivieso et al., 2004). La cepa *chs5Δ* presenta graves defectos en la fusión celular durante la conjugación, ya que no sólo interviene en el transporte polarizado de Chs3p, sino también en el de Fus1p, proteína implicada en la fusión de los *shmoos* (Santos et al., 1997).

5.7 Inactivación y reciclaje de Chs3p

Como ya se ha mencionado, Chs3p no se degrada en la vacuola sino que sus niveles se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular (Chuang & Schekman, 1996), y tras su endocitosis no sufre degradación proteolítica, sino que se mantiene estable en los quitosomas (Ziman et al., 1996). Hasta la fecha sólo se han descrito otras tres proteínas, a parte de Chs3p (Holthuis et al., 1998; Ziman et al., 1998), que se reciclan tras su endocitosis: Snc1p, Ste3p y

Ste6p. Snc1p es una v-SNARE que participa en la fusión de las vesículas secretoras a la MP, tras su inserción en la misma es endocitada y reciclada hacia el TGN donde participa en una nueva ronda de exocitosis. Snc1p se mantiene en una localización dinámica-estable entre el TGN y la MP (Lewis et al., 2000). Ste3p, el receptor de factor α , se endocita tras su unión al ligando y se recicla nuevamente hacia la MP pasando por el Golgi (Chen & Davis, 2000). Y finalmente, Ste6p es el transportador del factor α hasta la MP, y aunque una parte de la proteína entra en la ruta de degradación a vacuola, hay otra parte significativa que se recicla hacia el Golgi. Este transporte diferencial viene determinado por el grado de ubiquitinación de la proteína (Krsmanovic et al., 2005). Hasta la fecha ningún dato indica la existencia de un mecanismo de regulación común para todas estas proteínas.

En el caso de Chs3p, el uso de mutantes de endocitosis reduce drásticamente la cantidad de Chs3p en quitosomas purificados y aumenta su presencia en la MP (Chuang & Schekman, 1996; Ziman et al., 1996). Todo apunta a que tras su inserción en la MP, Chs3p es inactivada mediante endocitosis y pasa a residir nuevamente en los quitosomas. La naturaleza de los quitosomas no está claramente definida, y se ha postulado que son unas vesículas intermedias con características de endosomas tempranos y vesículas del TGN, ya que parece que Chs3p se mantiene en un equilibrio estable entre los dos compartimentos (Valdivia et al., 2002).

La salida de Chs3p desde los quitosomas no sólo está regulada por ciclo, sino que también ocurre tras la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a daño en PC o estrés celular (Valdivia & Schekman, 2003). En este caso la secreción de Chs3p no ocurre de forma polarizada, sino que se redistribuye por toda la MP para reforzar toda la PC por un proceso dependiente de Rho1p y Pkc1p, aunque no de sus efectores (Valdivia & Schekman, 2003). También requiere la actuación de Chs4-7p (Carotti et al., 2002; Garcia-Rodriguez et al., 2000). En estas condiciones se da un incremento de quitina que alcanza hasta el 20% de peso seco de la PC (Popolo et al., 1997). Y aunque se desconoce la relevancia biológica de los quitosomas todo indica que el control postraducciona l de Chs3p contribuye a una respuesta rápida ante situaciones de estrés.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

Para la realización de este trabajo se ha empleado la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*. En la **Tabla 3** 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 4**).

Tabla 3: Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> empleadas en este trabajo.		
Estirpe	Genotipo	Procedencia
W303a	MATa <i>can1 -100 ade2-1 his3 -11,15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i>	Colección del laboratorio
W303α	MATα <i>can1 -100 ade2-1 his3 -11,15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i>	Colección del laboratorio
W303 2n	MATa/MATα <i>can1 -100 ade2-1 his3 -11,15 leu2-3,12 trp1-1 ura3-1</i>	Colección del laboratorio
CRM103	W303 MATα <i>chs3::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM151	W303 MATa <i>chs4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM233	W303 MATα <i>chs4::HIS3</i>	Colección del laboratorio
CRM278	W303 MATa <i>chs4::HIS3 chs3::LEU2</i>	Colección del laboratorio
CRM218	W303 MATa <i>chs5::ADE2</i>	Colección del laboratorio
CRM275	W303 MATa <i>chs6::HIS3</i>	Colección del laboratorio
CRM215	W303 MATa <i>chs4::URA3 chs5::ADE2</i>	Colección del laboratorio
CRM380	W303 MATa <i>chs4::URA3 chs6::HIS3</i>	Colección del laboratorio
CRM209	W303 MATa <i>chs4::URA3 chs7::HIS3</i>	Colección del laboratorio
CRM212	W303 MATa <i>chs4::URA3 chs3::LEU2</i>	(Sanz et al., 2004)
CRM499	W303 MATα <i>chs4::HIS3 bni4::URA3</i>	(Sanz et al., 2004)
CRM976	W303 MATα <i>chs4::HIS3 chs3::LEU2 bni4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM892	W303 MATa <i>chs4::HIS3 chs3::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM872	W303 MATa <i>chs3::LEU2</i>	Colección del laboratorio
CRM483	W303 MATα <i>bni4::URA3</i>	(Sanz et al., 2004)
Y1306	MATα <i>ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp1-901 his3-Δ200 CHS3-3xHA</i>	(Santos & Snyder, 1997)
JAY29	Y1306 <i>chs4::URA3</i>	(Trilla et al., 1999)
JAY30	Y1306 <i>chs5::ADE2</i>	(Santos & Snyder, 1997)
BY4742	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
Y11969	BY4742 <i>end4::KanMX4</i>	Euroscarf
CRM926	BY4742 <i>end4::KanMX4 chs3::URA3</i>	Este trabajo
CRM927	BY4742 <i>end4::KanMX4 chs4::URA3</i>	Este trabajo
CRM1077	W303 MATα <i>chs6::HIS3 chs3::URA3</i>	Este trabajo
Y04119	BY4741 <i>aps1::KanMx4</i>	Euroscarf
Y01033	BY4741 <i>apm1::KanMx4</i>	Euroscarf
CRM924	BY4742 <i>chs3::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM925	BY4742 <i>chs4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM1110	BY4742 <i>chs6::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM1111	BY4741 <i>chs6::URA3 apm1::KanMx4</i>	Este trabajo
CRM1112	BY4741 <i>chs6::URA3 aps1::KanMx4</i>	Este trabajo
CRM1113	BY4741 <i>chs4::URA3 apm1::KanMx4</i>	Este trabajo
CRM1114	BY4741 <i>chs4::URA3 aps1::KanMx4</i>	Este trabajo
15Daub	MATa <i>bar1Δ URA3Δns leu2 ade1 his2 trp1</i>	Dr. S.I. Reed
CRM 237	15Daub <i>chs4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM504	15 Daub <i>chs3::ADE1</i>	Colección del laboratorio

CRM508	15 Daub <i>bni4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM1199	15 Daub <i>chs3::ADE1 chs4::URA3</i>	Colección del laboratorio
CRM1225	15 Daub <i>cdc28-13</i>	Dra. Henar Valdivieso
Y00568	BY4741 <i>erg6::KanMx4</i>	Euroscarf
CRM1243	BY4741 <i>bar1::LEU2</i>	Este trabajo
CRM1245	BY4741 <i>bar1::LEU2 erg6::KanMx4</i>	Este trabajo
YPH499	<i>MATa URA3-52 lys2-801 ADE2-101 trp1-Δ63 HIS3-Δ200 LEU2-Δ</i>	Dra. Anne Spang (Biozentrum, Basilea)
YAS1469	YPH499 <i>MATa CHS3-HBH::HphMX4</i>	Dra. Anne Spang (Biozentrum, Basilea)
CRM1149	YPH499 <i>CHS3-HBH::HphMX4 end4::TPRI</i>	Este trabajo
CRM1150	YPH499 <i>CHS3-HBH::HphMX4 chs5::TPRI</i>	Este trabajo

Tabla 4 : Estirpes de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo.

Nombre	Genotipo	Procedencia
CJ236	F', cat(=pCJ105 ; M13 ^S Cm ^R)/dut, ung 1, thi-1, relA 1, spoT 1, mcrA	<i>Bio Rad</i>
MAX efficiency DH5α	F- f80dlacZDM 15, D(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r _k -, m _k +), phoA, supE44, I-, thi-1, gyrA96, relA1	<i>Life Technologies</i>

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 Medios de cultivos para *E. coli*

Los medios empleados para el cultivo de *E. coli* fueron:

- **Medio LB** (Luria-Bertani medium): Bactotripton 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 1%, pH 7
- **Medio 2xYT**. Bactotripton 1%, extracto de levadura 1%, NaCl 1%, pH 7

Los medios necesarios para el crecimiento de *E. coli* se suplementaron con ampicilina (50 µg/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 -70°C en glicerol al 50%

2.2 Crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*

Los medios empleados para el crecimiento de *S. cerevisiae* fueron:

- **Medio YEP**: Extracto de levadura 1%, pepton 2%.
- **Medio YEPD**: Extracto de levadura 1%, pepton 2%, glucosa 2%.
- **Medio YNB (Medio Mínimo)**: Base nitrogenada sin aminoácidos 0.7%, glucosa 2%.
- **Medio Sintético Definido (Medios SD)**: Medio mínimo suplementado con una mezcla de 20 aminoácidos proteinógenos y otros nutrientes. A fin de mantener la presión

selectiva durante el crecimiento de las cepas transformadas con plásmidos, se eliminó del medio el suplemento correspondiente.

Los medios se solidificaron añadiendo agar al 2%. El crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae* se llevó a cabo en placas o matraces a 28°C y con una agitación de 250 rpm en el caso de los cultivos líquidos.

El crecimiento se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm 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. $1-2 \times 10^7$ céls/ml). Cuando fue preciso se determinó el número de células en un cultivo por conteo directo. 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 resiembras en placas de medio sólido, que se conservaron a 4°C entre 30 y 40 días. Las cepas se conservaron a -70°C en glicerol al 15%.

Para los ensayos de inducción del promotor *GALI*, las células se incubaron en medio YEP o SD, pero usando la rafinosa (2%) como fuente de carbono. En fase logarítmica de crecimiento se transfirieron los cultivos al medio correspondiente con galactosa (2%) y se recogieron las células a los tiempos indicados. En el caso de células tratadas con factor α , se añadió la galactosa directamente al cultivo (1% de concentración final).

2.3 Condiciones de esporulación de *S. cerevisiae*

Las células diploides crecidas en Medio YEPD hasta una DO_{600} 1.5-1.8 y tras dos lavados con agua estéril fueron transferidas a **Medio de Esporulación** (Extracto de levadura 0.1%, acetato potásico 1%, glucosa 0.01%) e incubadas a 25°C entre 3 y 4 días. Transcurrido este tiempo y tras un tratamiento con glusulasa (*Perkin-Elmer*) al 1% durante 5-10 minutos a 37°C, se procedía a la disección de las ascas con la ayuda de un micromanipulador automático (*Singer Instruments MSM SYSTEM*). Tras un crecimiento en placas de YEPD se seleccionaron los clones mediante la auxotrofia o resistencia correspondiente.

2.4 Tratamiento con factor α

Células de tipo sexual a de *S. cerevisiae* (*bar1Δ*), en fase logarítmica de crecimiento se transferían a medio YEPD a una DO_{600} final de 0.5-0.6. Tras 30-45 de incubación a 28°C para permitir la adaptación al medio, se añadía factor α (*Sigma*) a una concentración final de 200 ngr/ml y se incubaban nuevamente a 28°C con agitación durante 2-3 horas según las características del experimento.

2.5 Medios suplementados con drogas

El ensayo de resistencia a **calcoflúor** (*Blankophor BBH, Bayer*) se realizó en placas YEPD o SD, suplementadas con este antifúngico a la concentración final indicada (0-1 mg/ml). En el caso del medio SD era necesario tamponar el medio con Biftalato potásico 50mM pH 6,1 para evitar la precipitación del Calcoflúor. En la parte final del trabajo, las concentraciones utilizadas eran menores debido al cambio de producto (*Sigma*).

El ensayo de resistencia a **SDS** (dodecil sulfato sódico) se realizó en placas de YEPD o SD, suplementadas con SDS a una concentración final entre 0-0.006%. En el caso de la resistencia a **cafeína** la concentración final utilizada fue entre 0-5mM.

La resistencia en placa se realizó mediante el 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 DO₆₀₀ 1. Se hicieron diluciones 1/10 sucesivas y con un replicador estéril se depositaron las gotas sobre las placas suplementadas con la droga indicada.

El ensayo de resistencia a **Zimoliasa** se realizó en medio líquido YEPD o SD. Un cultivo en fase logarítmica se diluyó hasta DO₆₀₀ 0.005 en medio líquido fresco con cantidades crecientes de Zimoliasa 100T (0-10 Unidades) y se incubaron durante 16 horas a 28°C. Transcurrido este tiempo se midió la DO₆₀₀ de cada cultivo y los datos se representaron en escala logarítmica, referidos a los obtenidos en ausencia de la enzima.

2. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.1. Obtención de ADN

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se realizó usando el método de la lisis alcalina (Zhou et al., 1990), en el que las células se rompen en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). El ADN es precipitado posteriormente con etanol. Cuando se necesitaba ADN de mayor pureza o más concentrado, se utilizó el "Kit" *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* de *Promega*.

2.2 Tratamientos enzimáticos del ADN

Todos los protocolos usados para manipular el ADN, así como su transformación en las distintas cepas, se recogen en las publicaciones de (Sambrock & Russell, 2001).

Los principales tratamientos 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*, o la ADN polimerasa del fago T4.

2.3 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o amplificación por PCR 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 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5-7,8) y se añadió el agente intercalante, Bromuro de etidio, a una concentración final de 0,5 µg/ml.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* suministrado por *Amersham Biosciences*.

2.4 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador *My Cycler™* de *Bio Rad*.

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.....	10 min. a 94°C	
1) Desnaturalización del ADN.....	1 min. a 90°C	} 30 ciclos
2) Anillamiento.....	1 min. a 55°C	
3) Extensión.....	5 min. a 72°C	
Extensión final	10 min. a 72°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 (1µM cada uno), MgCl₂ 1,5 mM. La polimerasa empleada fue la RedAccuTaq® (*Sigma*) a 0,25 unidades/reacción y el tampón de reacción suministrado con la enzima. Los cebadores empleados en este trabajo fueron suministrados por las empresas Isogen (www.isogen.nl) y Thermo (www.thermo.com), sus secuencias y finalidad se describen en la **Tabla 5**.

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.

Tabla 5: Oligonucleótidos más relevantes empleados en este trabajo.		
Nombre	Secuencia	Finalidad
CHS4-530 SspI	CCTCTTGTCTCCT <u>CTA</u> ATATTAAGCTTTCTC G	Construcción truncación Chs4p-Δ530
CHS4-560 SspI	GAATAAATTCAAAGTACT <u>CTA</u> ATATTAAT TTTTTTTATGCTG	Construcción truncación Chs4p-Δ560
CHS4-590 SspI	GGATTTCAGT <u>CTA</u> ATATTATTCAGATTT TGAAG	Construcción truncación Chs4p-Δ590
CHS4-625 SspI	GGAGAACTTTT <u>CTA</u> ATATTATGTATCAGA ACCCG	Construcción truncación Chs4p-Δ625
CHS4-PCR1	ATTAGCGGACGGCTACTC	PCR degenerada de CHS4. <i>reverse</i>
CHS4-PCR2	CTTGTTGACTGTCCACA	PCR degenerada de CHS4. <i>forward</i>
CHS4-NcoI	TAATCC <u>ATG</u> GCAAGTTCACCGCAG	Dos híbridos. Sitio NcoI antes del ATG
CHS4-C SmaI	TAACCCGGGAGTGTA ^{AACTGTTGCAC}	Dos híbridos. Sitio SmaI después del codón de parada
CHS3-Nterminal (TH) NcoI	AATTAGCCATGGCCGGCTGAATGGAGA TG	Dos híbridos. Sitio NcoI antes del ATG
CHS3- Cterminal (TH) SmaI	TCGTTGCCCGGGCCCT TAATTAACCATC	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 700 (Chs3pNt)
CHS3 D170 SmaI	TGACCCGGGTAGCTACATCTGCCAAAAT GACAATGT	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 170
CHS3 D230 SmaI	TGACCCGGGTAGCTACGAACTACTACAA ACGGT	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 230
CHS3 D434 SmaI	TGACCCGGGAATCTATTCGCTCAAACATC TCGC	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 434
CHS3 D490 SmaI	TGACCCGGGTTTCTAGTCCACGATATATG CACC	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 490
CHS3 D855 SmaI	TGACCCGGGAGGCTATTTAACCATTTCAG CGACC	Dos híbridos. Sitio SmaI truncación 855
CHS3 210 ATG NcoI	AATTAGCCATGGGTGCGATTGTGGCTTTC	Dos híbridos. Sitio NcoI truncación 210-855
CHS3 434 ATG NcoI	AATTAGCCATGGCGAGATGTTTGAGCGA A	Dos híbridos. Sitio NcoI truncación 434-855
CHS3 470 ATG NcoI	AATTAGCCATGGCCTGCTACTTCCGTTG	Dos híbridos. Sitio NcoI truncación 470-855
CHS3 K136R A	GCGGAAGACGAATTCGATCGAGATGGTG AT	Mutagénesis Lis136 x Arg
YPT32-N SpeI	CCACTAGTATGAGCAACGAAGATTACGG	Construcción YPT32 bajo promotor GAL1
YPT32-C Sall	GCGTCGACCCATGCGACCTTAGTAGGGC	Construcción YPT32 bajo promotor GAL1
CHS3 Δ63 N-t	CCGCAGGAAAGAAATTAGAATGACGCAG GAGCAGATGAATCAC	Delección del extremo N-t de Chs3p
CHS3 Δ126 N-t	CCGCAGGAAAGAAATTAGAATGGATGAA GGTGTTGCGGAAGACG	Delección del extremo N-t de Chs3p
CHS3 Δ194 N-t	CCGCAGGAAAGAAATTAGAATGGAAAGA CAAATGGCGTGGAGAG	Delección del extremo N-t de Chs3p
<p>Los codones de inicio y de parada se indican en color rojo. Los sitios de restricción introducidos se señalan subrayados.</p>		

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se clonaron directamente en el plásmido pGemT (ver Apartado 2.7.1).

2.4.1 PCR degenerada

Para obtener una población de moléculas de *CHS4* mutadas al azar, se realizó una PCR degenerada sobre este gen. Se utilizó la enzima EcoTaq DNA polimerasa (*Ecogen*) con el tampón suministrado por el fabricante. A la mezcla de reacción se añadió MgCl_2 1,5 mM, y 20 ng por cada 50 μl de mezcla de reacción del plásmido pRS315-*CHS4*. Además, para inducir errores en el proceso de amplificación, se añadió una mezcla no equitativa de nucleótidos, que contenía dCTP/dTTP/dGTP 0.2 mM de cada uno y dATP 0,04 mM. Como cebadores de la reacción se utilizaron los oligonucleótidos CHS4 PCR1 y CHS4 PCR2 (**Tabla 5**)

Posteriormente, los fragmentos amplificados se contranformaron en una cepa *chs4A*, junto con el plásmido pRS315-*CHS4-GFP* linearizado con *NheI*, que corta dentro de la región a recombinar. Los productos de PCR contenían extremos flanqueantes homólogos al plásmido linearizado, de esta forma se dirige la recombinación *in vivo*, según se describe en (Muhlrads et al., 1992). Típicamente la mayor parte de las colonias recuperadas (>90%) contenían plásmidos recombinantes.

2.5 Secuenciación de ácidos nucleicos

La técnica usada se basa en la descrita por (Sanger et al., 1977), pero en este caso se emplearon dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer cada uno de ellos. Se utilizó un secuenciador *ABI 377* (*Applied Biosystems*). Las secuencias se importaron mediante el programa *Chromas*, que muestra el cromatograma de la reacción y la secuencia de ADN correspondiente. Todas las reacciones se llevaron a cabo en el servicio de secuenciación de la USAL.

2.6 Mutagénesis dirigida *in vitro*

Se utilizó el sistema *Muta Gene Fagemid* de *Bio Rad*, que se basa en el método descrito por (Kunkel, 1985). Para la mutagénesis empleamos la cepa CJ236 de *E. coli* que cuenta con:

- El episoma F', que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07.
- La mutación *dut*, que inactiva la enzima dUTPasa. Los elevados niveles intracelulares de dUTP, hace que las moléculas de ADN sintetizadas porten uracilo en vez de timina.
- La mutación *ung*, que inactiva la uracilo N-glicosilasa, y así el uracilo incorporado al ADN no puede ser eliminado.

Para llevar a cabo las reacciones de mutagénesis se emplearon los oligonucleótidos

cebadores recogidos en la **Tabla 5** y se procedió del siguiente modo:

- La estirpe CJ236 se transformó con el ADN bicatenario que se pretendía mutagenizar y se inoculó en medio 2xYT líquido.
- Se infectaron las colonias resultantes con el fago M13K07.
- Se recuperaron las moléculas de ADN de cadena sencilla contenidas en los fagos.
- Estas cadenas ricas en uracilo se usaron como molde para sintetizar *in vitro* las hebras complementarias. El cebador empleado fue el oligonucleótido que contenía la mutación que queríamos introducir, previamente fosforilado. La fosforilación de los oligos se llevó a cabo de la siguiente forma: 20 µl de H₂O, 1 µl de la enzima polinucleótido kinasa (PNK) (*Fermentas*), 3 µl de tampón de PNK, 1 µl de ATP 100mM y 5 µl de oligonucleótido 20 mM. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. La síntesis de doble cadena *in vitro* se realizó siguiendo la siguiente reacción con cantidades crecientes de oligonucleótido fosforilado llevado a un volumen final de 10µl:

Buffer de anillamiento	ssDNA	Oligonucleótido fosforilado	Agua	Volumen final
1 µl	1 µl	0 µl	8 µl	10 µl
1 µl	1 µl	0.5 µl	7.5 µl	10 µl
1 µl	1 µl	1 µl	7 µl	10 µl

A continuación se incubó 5 minutos a 70-75°C y luego se dejó bajar la temperatura progresivamente hasta los 35°C.

Se pasó a hielo y se añadió a cada tubo 3 µl de la mezcla siguiente: 1 µl de tampón de síntesis, 1 µl Ligasa T4 (*USB*), 0,8 µl tampón de dilución de polimerasa T7 y 0,2 µl polimerasa T7 (*USB*). Se incubó 5 minutos en hielo, 5 minutos a temperatura ambiente y 1,5 horas a 37°C.

- Se transformó la cepa DH5α con 10µl de ADN bicatenario. DH5α no es mutante *ung* e inactiva la hebra rica en uracilo del ADN, replicando de forma casi exclusiva, la hebra sin uracilo, que es la portadora de la mutación.

2.7 Vectores utilizados

2.7.1 Vectores de *E.coli*

pGEMT (*Promega*): Es un vector derivado del plásmido pGEM-5f(+) que se comercializa linealizado con una timidina adicional en los extremos que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR.

2.7.2 Vectores de *S. cerevisiae*

Los vectores de *S. cerevisiae* empleados en este trabajo son los de la serie pRS310:

pRS313, pRS314, pRS315 y pRS316 (Sikorski & Hieter, 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 *ARS4* y una secuencia centromérica *CEN6*, lo que les confiere 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 2 μ de *E. coli* por lo que se mantienen en alto número de copias (20-30 por célula). Los plásmidos de esta serie se han utilizado para los experimentos de sobreexpresión.

Los plásmidos usados en este trabajo se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Plásmidos utilizados en este trabajo	
Nombre	Procedencia
pRS314- <i>CHS4</i>	(Trilla et al., 1997)
pRS424- <i>CHS4</i>	(Trilla et al., 1997)
pRS315- <i>CHS4</i> -GFP	(Sanz et al., 2004)
pRS315- <i>CHS4</i> -3xHA	(Trilla et al., 1997)
pRS314- <i>CHS4</i> -3xHA	(Trilla et al., 1997)
pRS314- <i>CHS4</i> -GFP	(Sanz et al., 2004)
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 530-GFP	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 560-GFP	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 590-GFP	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 625-GFP	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> ^{C693S} -GFP	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 590	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> ^{C693S}	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> Δ 590-3xHA	Este trabajo
pRS314- <i>CHS4</i> ^{C693S} 3-xHA	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M1'-GFP	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M3'-GFP	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M7'-GFP	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M9'-GFP	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M12'-GFP	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M1'-3xHA	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M3'-3XHA	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M7'-3XHA	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M9'-3XHA	Este trabajo
pRS315- <i>CHS4</i> M12'-3XHA	Este trabajo

Nombre	Procedencia
pRS316- <i>CDC3</i> -GFP	(Caviston et al., 2003)
pRS314- <i>BNI4</i> -YFP	Este trabajo
pHV7-C-HA	(Cos et al., 1998)
pHV7-GFP	Colección del laboratorio
YpLac111- <i>CHS3</i> -GFP	J. Rodríguez-Medina
pRS315- <i>CHS3</i> -3xHA	Colección del laboratorio
pRS315- <i>CHS3</i> -GFP	Colección del laboratorio
pRS314- <i>GAL1</i> - <i>YPT32</i>	Este trabajo
pRS314- <i>GAL1</i> - <i>CHS4</i> -GFP	Este trabajo
pRS314- <i>GAL1</i> - <i>CHS3</i> -GFP	Este trabajo
pRS316- <i>FUS1</i> -GFP	Dra. B. Santos
pRS316- <i>BUD6</i> -GFP	Dr. Scott Erdman
pRS314 - <i>CHS3</i> ^{K136R} -GFP	Este trabajo
pRS315- Δ 64 <i>CHS3</i> -GFP	Este trabajo
pRS315- Δ 126 <i>CHS3</i> -GFP	Este trabajo
pRS315- Δ 194 <i>CHS3</i> -GFP	Este trabajo

Los marcajes de CHS4, tanto el 3xHA como la GFP, se localizan en el extremo N-terminal de la proteína (Sanz et al., 2004). El resto de proteínas se encuentran marcadas en el extremo C-terminal. El plásmido pHV7, es un derivado del Ypc50 que contiene CHS3 marcado con 3xHA o con GFP en su extremo C-terminal.

3. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Para llevar a cabo estas técnicas se empleó un microscopio *Leica DM RXA* equipado con un sistema de iluminación halógena y un equipo de fotografía digital.

3.1 Microscopía de contraste de fases

Para la observación de las cepas de *S. cerevisiae* se realizaron preparaciones húmedas de cultivos en medio líquido.

3.2 Microscopía de fluorescencia

La observación de muestras con fluorescencia se realizó en el microscopio descrito anteriormente mediante la iluminación de las mismas con un sistema de epifluorescencia empleando una lámpara de mercurio de 100W. 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. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con el programa *Adobe Photoshop*.

3.2.1 Fluorescencia directa con GFP, YFP o CFP

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 ultravioleta de longitud de onda de 395 nm. Por ello, basta con fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la expresión de esta proteína híbrida al microscopio de fluorescencia. Derivadas de la GFP son las proteínas YFP y CFP que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

Para observar las proteínas marcadas con GFP, el medio fue suplementado con Adenina (50mg/L) para suprimir la autofluorescencia celular.

3.2.2 Tinción con Calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo de tipo directo 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, podemos visualizar las zonas donde se está sintetizando quitina activamente.

El Calcoflúor se preparó en agua a una concentración de 10 mg/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.

Sobre un cultivo líquido de células en fase logarítmica creciendo en YEPD, se añadió Calcoflúor (*Blankophor BBH*) a una concentración final 75 μ gr/ml y se incubaron durante 2-3 horas en agitación a 28°C. En el caso de cepas portadoras de plásmidos el preinóculo de este cultivo se realizó en el correspondiente medio selectivo. En fase logarítmica de crecimiento se transfirió a medio YEPD, se incubó durante 30 minutos para permitir la adaptación al medio y se le añadió Calcoflúor. El cambio de medio se realizó para evitar la precipitación del calcoflúor en medio SD.

3.2.3 Tinción con WGA-FITC

La aglutinina de germen de trigo (WGA) es una lectina que se une específicamente a residuos de N-AcetilGlucosamina y ácidos siálicos. Para detectar estos compuestos sobre la superficie celular generalmente se encuentra conjugada con el fluorocromo FITC (fluoresceína-5-isotiocianato), de tal modo que podemos realizar una tinción de las células con este compuesto y visualizarlo mediante microscopía de fluorescencia.

La tinción se realizó añadiendo 1 μl de WGA-FITC (*Sigma*) sobre 10 μl de una suspensión de células en CO_3HNa 50 mM. En algunas ocasiones las células carecían de la fracción álcali soluble de la pared celular al haber sido sometidas a un tratamiento con NaOH 1,5M caliente. Tras 10' de incubación a temperatura ambiente, las muestras se lavaron con 1ml de CO_3HNa 50 mM para eliminar el exceso de WGA-FITC que no se hubiera unido a las paredes celulares. Por último, se resuspendieron las células en 10 μl de agua y se observaron las preparaciones al microscopio óptico de fluorescencia.

3.2.4. Tinción con actina

Para esta tinción se aprovecha la propiedad de la Faloidina, toxina extraída del hongo *Amanita phalloides*, de unirse con alta afinidad a la F-actina (filamentos de actina). La Faloidina unida a un compuesto fluorescente, en este caso el Alexa Flúor 488[®], se utilizó como sonda para detectar y teñir la actina en el interior celular.

La tinción de actina se realizó siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por F. Chang a partir del protocolo inicial descrito por (Marks & Hyams, 1985). Partiendo de un cultivo en fase exponencial se tomaron 5 ml de células y se fijaron añadiendo 1ml (1/5 del volumen de cultivo) de Fomaldehído 16% (*EM-grade MeOH free de PolyScience*) y 500 μl (1/10 del volumen de cultivo) de tampón PEM (PIPES 100mM, EGTA 1mM, Mg_2SO_4 1mM, pH 6,9). Las células se incubaron en agitación a la temperatura de cultivo durante una hora y posteriormente se lavaron tres veces con tampón PEM. Se recogieron las células y se permeabilizaron resuspendiéndolas durante 30s en PEM con Tritón X-100 al 1%, para permitir la entrada del colorante.

Finalmente, se lavaron tres veces de nuevo con PEM, se tomaron 0,5 μl de las células previamente permeabilizadas y se añadieron 4 μl de Alexa Flúor 488-Faloidina (*Molecular Probes*) resuspendida en PEM. Estas muestras se incubaron en oscuridad de 45 a 60 minutos en un agitador orbital. Las muestras así teñidas pueden guardarse durante 1 ó 2 días a 4°C.

3.2.5 Tinción con FM4-64

El FM4-64 es un compuesto rojo-fluorescente de carácter lipofílico que se usa para en el estudio de membranas y transporte vesicular. Para la visualización de las zonas activas de endocitosis, se añade FM4-64 (*Molecular Probes*) a una concentración final de 10 μM al cultivo líquido de células. A continuación, y sin tiempo de incubación, se lava dos veces con medio fresco y se observa al microscopio de fluorescencia.

3.2.6 Microscopía Confocal

Se utilizó un microscopio confocal con láser espectral, *Leica TCS-SL* para observar con más detalle las estructuras celulares. Las imágenes fueron procesadas utilizando el

programa asociado a este microcopio, denominado *Leica Confocal Software* (LCS). De esta forma se obtuvo un perfil de intensidades de fluorescencia en unidades arbitrarias.

4. DETERMINACIÓN DE LA CANTIDAD DE QUITINA

La valoración de quitina se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en (Bulawa et al., 1986). Se recogieron 100 mgr de células en fase logarítmica y se extrajo la capa más externa de la pared con 1 ml de KOH al 6% durante 90 minutos a 80° C. Tras enfriar las muestras, se añadió 0,1 ml de ácido acético glacial para neutralizar el pH de la suspensión y se lavaron con agua hasta pH neutro. A continuación se resuspendieron las células en 560 µl de NaPO₄ 50 mM pH 6,3 y se trataron con 40 µl de quitinasa (0.637 mU/ml) de *Serratia marcescens* (Sigma). La reacción se incubó durante 2h a 37° C y para detenerla se hirvieron las muestras durante un minuto. Finalmente, a 400 µl de la reacción anterior se añadieron 25 µl de glucosidasa (*Perkin Elmer*) y se incubó durante 1h a 37° C para degradar los dímeros de quitina (quitobiosa) resultantes del tratamiento con quitinasa, a monómeros de NAcGln. Se detuvo la reacción hirviendo las muestras durante un minuto. La cuantificación de NAcGln se llevó a cabo mediante el ensayo colorimétrico descrito por Reissig (Reissig et al., 1955) empleando como referencia una recta patrón de NAcGln (0-0,1 µM). La cantidad de quitina se expresaba en nmoles de NAcGln/100 mgr de células.

5. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD QUITÍN SINTASA III

La medida de la actividad quitín sintasa (QS) se llevó a cabo utilizando extractos crudos de membrana para determinar la incorporación de radiactividad en material insoluble (quitina) a partir del sustrato UDP-[¹⁴C]-NAcGln. Las membranas celulares se obtuvieron según el protocolo descrito por (Choi & Cabib, 1994).

La valoración *in vitro* de la actividad QSIII se realizó sin y con activación proteolítica de las muestras según el protocolo descrito (Choi & Cabib, 1994). Dicha activación proteolítica se realizó mediante un tratamiento controlado con tripsina.

Sin activación proteolítica

La mezcla final de reacción contenía: 20 µl de la preparación de membranas, 30 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM acetato de cobalto (*Merck*), 32 mM NAcGln, 1,1 mM UDP-[¹⁴C]-NAcGln (20000 cpm, 293 mCi/mmol) (*Amersham*) en un volumen final de 50 µl. La reacción se incubó durante 90' a 30° C.

En el caso de los mutantes *end4Δ*, se añadió acetato de níquel 5 mM a esta mezcla de reacción con el fin de inhibir la actividad QSII. En este mutante las muestras sin activación proteolítica presentan unos niveles muy altos de actividad QSII.

Con activación proteolítica

En este caso, la mezcla final de reacción contenía: 20 μ l de la preparación de membranas, 30 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM acetato de cobalto (*Merck*), de 5 mM de acetato de níquel (*Merck*), 1,1 mM UDP-[14 C]-NACGln (20000 cpm, 293 mCi/mmol) (*Amersham*) y de 1-3 mg/ml de tripsina (*Sigma*) en un volumen final de 46 μ l. La reacción se incubó durante 15 minutos a 30° C para favorecer la activación proteolítica. Transcurrido este tiempo se añadió a las muestras 9 μ g de inhibidor de tripsina (4,5 mg/ml, *Sigma*) y NACGln a una concentración final de 32 mM hasta un volumen final de 50 μ l. Las muestras se volvieron a incubar durante 90 minutos a 30° C.

En todos los casos, la reacción se detuvo añadiendo 2 ml de TCA (*Merck*) al 10%. La quitina formada se recogió en filtros de fibra de vidrio *GF/C de Whatman* y la radioactividad incorporada se midió en un contador de centelleo *Wallac 1409*. El cálculo de la actividad específica se expresó en nmoles de NACGln incorporados por hora y por mg de proteína.

El cálculo de la K_m y la $V_{m\acute{a}x}$ se realizó utilizando las representaciones gráficas de los dobles recíprocos de Lineweaver-Burk.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1 Obtención de extractos de proteínas

Los extractos de proteínas se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por (Sambrook, 1989). Se recogieron 20 ml de células en fase logarítmica mediante centrifugación y se resuspendieron en 100 μ l de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8, NaCl 150 mM y 0.1% Tritón X-100 (*Sigma*)) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (1mM PMSF (*Sigma*), 1 μ g/ml apoproteína (*Sigma*), 1 μ g/ml leupeptina (*Sigma*) y 1 μ g/ml pepstatina (*Sigma*)). Se cubrió la suspensión con bolas de vidrio (*B. Braun Biotech Int.* de 0,45 mm de diámetro) y se rompieron en un agitador *Fast-Prep FPI20 Bio 101 (Savant)* en tres intervalos de 12 segundos a una velocidad de 5,5. El lisado se centrifugó a 6000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de células, paredes celulares y bolas de vidrio. Todo el proceso se realizó 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). A 100 μ g de proteína total se le añadió el mismo de volumen de tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 2%, β -mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol 0,08%) y se desnaturizó durante 5 minutos a 100°C. En el caso de la proteína Pma1p, la desnaturalización se llevó a cabo durante 45 minutos a 37°C. Para la realización del SDS-PAGE e inmunodetección se cargaron típicamente entre 25 y 30 μ g de proteína total.

6.2 Separación electroforética e inmunodetección

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida (7,5-8%) 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 28,8g/l.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (*ImmobilonTM-P*, Millipore), mediante el sistema *Mini-Trans-Blot* (*Bio-Rad*) durante 1-1,5 horas a 400mA, usando como tampón Tris-Glicina (Tris base 3 g/l y glicina 14,4 g/l).

Las membranas se bloquearon en TBS-T (Tris base 2,5 g/l, NaCl 9 g/l y 0,3% de *Tween 20* de *Sigma*) con leche al 2% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubaron durante 60-90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo. Se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS-T 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 TBS-T y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Se empleó el “kit” *ECL* de *Amershan*. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron utilizando películas *X-Ray Film 100NIF* de *Fujifilm*.

Los anticuerpos **primarios** utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal 12CA5 (*Boehringer*) contra el epítipo HA, a una dilución 1: 5000.
- Anticuerpo policlonal de conejo α -Pma1p (Serrano et al., 1986). Dilución 1:80000
- Anticuerpo monoclonal de ratón α -Pep12 (*Molecular Probes*). Dilución 1:6666
- Anticuerpo monoclonal de ratón α -GFP (*Living Colors*). Dilución 1:2000
- Anticuerpo policlonal de conejo α -Chs3p (Dra. A. Spang, Biozentrum, Basilea). Dilución 1: 2500

Los anticuerpos **secundarios** utilizados fueron:

- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (*Biorad*) a una dilución 1:7500.
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo unido a peroxidasa de rábano (*Biorad*) a una dilución 1:5000.

6.3 Fraccionamientos subcelulares

6.3.1 Fraccionamientos subcelulares simples

Para separar proteínas asociadas a la fracción particulada (fracción de membranas) de las del resto de componentes celulares se siguió el protocolo descrito en (Cos et al., 1998). Para ello 10 ml de un cultivo de células en fase exponencial de crecimiento fueron recogidas por centrifugación y resuspendidas en 250 μ l de Tampón BB (Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM y Tritón X-100 0,1%) conteniendo la mezcla de inhibidores de proteasas. La suspensión celular se introducía en tubos de 1.5 ml y se sometía a ruptura mecánica (ver apanado 6.1 de Materiales y métodos). Para eliminar las paredes celulares y las células enteras los extractos se sometían a centrifugación (5 minutos a 500g). Para determinar la naturaleza de la interacción entre una proteína de interés y la fracción particulada, se trató el sobrenadante así obtenido con Urea 4M o con agua como control, durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, se sometió a centrifugación (120.000g) durante 30 minutos, obteniéndose un precipitado (P_0), conteniendo la fracción particulada, y un sobrenadante (S_0), con la fracción soluble. Ambas fracciones se resuspendían en un volumen similar de tampón BB y se procesaban para una electroforesis desnaturalizante.

6.3.1 Fraccionamiento subcelulares en gradiente continuo de sacarosa

Se recogieron 500 ml de cultivo en medio SD en fase logarítmica (DO_{600} 0,5-1) por centrifugación en frío, y se lavaron con 50mM Tris-HCl pH7.5/ 10mM NaN_3 / 10 mM NaF y después con 50mM Tris-HCl pH7.5/ 1mM EDTA. Todo estos lavados se realizaron en frío y manteniendo las células en hielo para evitar la degradación de proteínas. Las células se resuspendieron en 1ml de Buffer de Lisis: 10% de sacarosa (peso/volumen)/ 10mM HEPES pH7.5/ 1mM EDTA conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas, y se transfirieron a un tubo corex de 25ml. Se añadió bolas de vidrio a la suspensión y las células se rompieron usando el vortex con 10 pulsos de 30 segundos y con ayuda de una varilla de vidrio. Se centrifugó durante 5 minutos a 500 g y se recogió el sobrenadante. El lisado se cargó en la parte superior de un gradiente lineal de sacarosa (15-60%) de 10ml, preparado en 10mM de HEPES pH7.5/ 1mM de EDTA. A continuación los gradientes se centrifugaron en un rotor SW40Ti a 170.000 g durante 18 horas a 4°C (*Beckman L8-70 Ultracentrifuge*). Se recogieron fracciones de 400 μ l con la ayuda de una bomba peristáltica empezando desde la parte inferior del tubo.

Para la visualización de las proteínas, se cargó un volumen equivalente de cada fracción en geles de acrilamida. La correcta formación del gradiente se analizó determinando el porcentaje de sacarosa en cada fracción utilizando un refractómetro modelo Abbe (*Atago*).

6.3.2 Fraccionamiento subcelulares en gradiente discontinuo de sacarosa

Para poder detectar Chs3p en la MP se realizaron fraccionamientos subcelulares en gradientes discontinuos de sacarosa básicamente como se describe en (Valdivia et al., 2002) con algunas modificaciones. Se recogieron 40 ml de cultivo en medio SD en fase logarítmica (DO_{600} 0,5-1) por centrifugación en frío, y se lavaron con 1 ml de 50mM Tris-HCl pH7.5/ 10mM NaN_3 / 10 mM NaF y después con 50mM Tris-HCl pH7.5/ 5mM EDTA. Las células se resuspendieron en 200 μ l de Buffer de Lisis: 10% de sacarosa (p/v)/ 10mM Tris-HCl pH7.5/ 5mM EDTA conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas. Se transfirieron a un tubo corex de 25ml. Se añadió bolas de vidrio a la suspensión y las células se rompieron usando el vortex con 5 pulsos de 30 segundos y con ayuda de una varilla de vidrio. Se centrifugó durante 5 minutos a 500 g y se recogió el sobrenadante. El lisado (~200 μ l) se cargó en la parte superior de un gradiente discontinuo de sacarosa (0.3 ml 55%/ 0.75 ml 45%/ 0.5 ml 41%/0.3 ml 37%/0.25 ml 29%/ en 10mM Tris-HCl pH7.5/ 5mM EDTA) y se centrifugó en un rotor SW65Ti a 200.000 g durante 3.5 horas a 4°C (*Beckman L8-70 Ultracentrifuge*). Se recogieron 7 fracciones de 300 μ l desde la superficie de forma manual usando una micropipeta. Finalmente, se cargó un volumen equivalente de cada fracción en geles de acrilamida para realizar la inmunodetección.

6.4 Inmunofluorescencia indirecta

La localización *in vivo* de las proteínas de interés, en células fijadas, se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta siguiendo el protocolo descrito (Bahler & Pringle, 1998), con ligeras modificaciones. Para ello, 20 ml de células procedentes de un cultivo en fase exponencial de crecimiento se fijaban con formaldehído, a una concentración final de 3,7%, durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Las células fijadas se lavaban dos veces con PEM (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM Mg_2SO_4 , pH 6,9) y se trataban durante 30-45 minutos con 0,1% β -mercaptoetanol, 0,02% gluculasa (*Dupont*) y 5 μ gr/ml Zimoliasa 100T (*Seikagaku Co., LTD.*) en PEMS (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM Mg_2SO_4 , 1,2 M Sorbitol, pH 6,9) a 37°C, para eliminar la pared celular. Los protoplastos así obtenidos se permeabilizaban con PEMS suplementado con Tritón X-100 (*Sigma*) al 1% durante 30", y posteriormente se bloqueaban durante 30 minutos a temperatura ambiente con PEMBAL (100 mM PIPES, 1 mM EGTA, 1 mM Mg_2SO_4 , 100 mM lisina (*Sigma*), 0,1% NaN_3 , 1% BSA, pH 6,9). La incubación con el primer anticuerpo, anti HA11(*BAbCO*) o anti-cdc11, se realizó a 4°C durante toda la noche en PEMBAL, en una dilución 1:75 o 1:100, respectivamente. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante 3 lavados con PEMBAL suplementado con Tritón X-100 al 0,1%. La incubación con el anticuerpo secundario, anti-ratón conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor 594[®] o anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488[®] (*Molecular Probes*), tenía lugar durante 1 hora en PEMBAL en una dilución 1:800 o 1:400, respectivamente. Igualmente el exceso de anticuerpo se eliminó por sucesivos lavados con PEMBAL. Las muestras se conservaron a 4°C hasta su observación al microscopio de fluorescencia.

6.5 Aislamiento de Membranas Resistentes a Detergente (Lipid-Rafts)

Para la obtención de membranas resistentes a detergentes, se siguió el protocolo descrito en (Bagnat et al., 2000), con algunas modificaciones. Se recogió un cultivo de 75 ml de células en fase logarítmica, se lavó una vez con agua y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Las células se resuspendieron en 500 µl de Buffer TNE (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl y 5 mM EDTA) conteniendo Inhibidores de Proteasas, y se rompieron con bolas de vidrio en tubos corex con 5-10 pulsos de 30 segundos y con ayuda de una varilla de vidrio. El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 500g en frío y el sobrenadante se incubó durante 30 minutos con Tritón X-100 a una concentración final del 1% en hielo. Transcurrido este tiempo se mezclaron 350µl de extracto con 700µl de Optiprep (*Nycomed*) quedando la solución al 40%. Se depositó en el fondo del tubo a centrifugar y encima se cargaron 1680 µl de Optiprep al 30% en TXNE (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA y 0.1% Tritón X-100) y posteriormente 280 µl de TXNE. Se centrifugó durante 2 horas a 200.000g en un rotor SW55Ti a 4°C y se recogieron 6 fracciones de 500µl desde la superficie de forma manual. Se cargó 20µl de cada fracción en un gel de acrilamida para realizar la inmunodetección.

6.6 Agregación de Chs3p

Para determinar el grado de agregación de Chs3p se siguió el protocolo descrito en (Kota & Ljungdahl, 2005) con ligeras modificaciones. Se recogieron 60 ml de cultivo a DO₆₀₀ y tras dos lavados con agua, se resuspendieron las células en 200µl de PBS pH7.4 con Inhibidores de Proteasas. Las células se rompieron en un agitador *Fast-Prep* en tres intervalos de 12 segundos a una velocidad de 5,5. El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 500g. Se determinó la concentración de la proteína en el sobrenadante y se incubó 40µl de reacción conteniendo 10µgr de proteína con DSP (Dithiobis [succinimidyl propionate]) (*Pierce*) a una concentración final de 5mM, durante 30 minutos a 22°C. Transcurrido este tiempo se detuvo la reacción de “crosslinking” añadiendo Tris HCl pH7.5 a una concentración final 30mM y se incubó 30 minutos a 22°C. Posteriormente, parte de las muestras fueron tratadas con DTT a una concentración final 40mM para revertir el “crosslinking”, y las que no fueron tratadas se mantuvieron en hielo. Para la realización de un Western-Blot se cargó el mismo volumen de cada muestra.

6.7 Purificación de Chs3p

Para purificar Chs3p para la Espectrometría de Masas (EM), se utilizó una cepa cedida por la Dra. A.Spang en la cual Chs3p presentaba en su extremo terminal un marcaje HBH (dos colas de Histidina y una de Biotina). La purificación se realizó en condiciones desnaturalizantes siguiendo básicamente el protocolo descrito en (Tagwerker et al., 2006). Se

recogieron 1.5 litros de cultivo a DO_{600} 1.5 por centrifugación y las células se resuspendieron en 40 ml de Buffer 1 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Fosfato Sódico pH 8, 0,5% Tween-20 y 20mM Imidazol). A continuación se rompieron las células con bolitas de vidrio usando un agitador especial para tanto volumen (*Biospec Modelo 1107900*) durante 3 minutos. El lisado se centrifugó durante 10 minutos a 2500g y el sobrenadante se centrifugó nuevamente durante 10 minutos a 15700g. A continuación se mide la cantidad de proteína del sobrenadante mediante Bradford, y se añade 50 μ l de bolas de Níquel (*NI-NTA His-Bind Resin* de Novagen), previamente equilibradas en Buffer 1, por cada mgr 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 Buffer 1 con un volumen de 5 veces la columna de Níquel
- 2 lavados con Buffer 2 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Fosfato Sódico **pH 6.3**, 0,5% Tween-20) con un volumen de 5 veces la columna de Níquel
- 2 lavados con Buffer 3 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Fosfato Sódico **pH 6.3**, 0,5% Tween-20 y **20mM Imidazol**) con un volumen de 5 veces la columna de Níquel
- 2 lavados con Buffer 4 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Fosfato Sódico **pH 6.3**, 0,5% Tween-20 y **40mM Imidazol**) con un volumen de 5 veces la columna de Níquel. Como se observó que el aumento de la concentración de Imidazol a 40mM eluía una parte de Chs3p-HBH se decidió repetir dos lavados más con el Buffer 3.

La elución se realizó con Buffer 5 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Fosfato Sódico **pH 4.3**, 0,5% Tween-20) con un volumen de 5 veces la columna de Níquel. 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 1 μ l de bolas de estreptavidina (*Pierce*), previamente equilibradas en Buffer 1, por cada mgr de proteína total. Se incubó toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se realizaron los siguientes lavados:

- 2 lavados con Buffer 6 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 2% SDS) con un volumen de 20 veces la columna de estreptavidina.
- 2 lavados con Buffer 7 (8 M urea, 1.2M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.2% SDS, 10% EtOH, 10% Isopropanol) con un volumen de 20 veces la columna de estreptavidina.
- 2 lavados con Buffer 8 (8 M urea, 1.2M NaCl, 50 mM Tris-HCl **pH 5**, 0.2% SDS, 10% EtOH, 10% Isopropanol) con un volumen de 20 veces la columna de estreptavidina.
- 2 lavados con Buffer 9 (8 M urea, 1.2M NaCl, 50 mM Tris-HCl **pH 8.9**, 0.2% SDS, 10% EtOH, 10% Isopropanol) con un volumen de 20 veces la columna de estreptavidina.

A continuación se transfirieron las bolitas a un tubo de 1.5 ml con 1 ml de Buffer 10 (8 M urea, 300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.2% SDS) y para someterlo al SDS-PAGE, se eluyó parte de la muestra con Buffer de elución (5mM EDTA en Formamida) durante 10 minutos a 100°C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo al que se le añadió de tampón de carga 2X y se sometió a Western-Blot y tinción de plata.

La purificación de Chs3p a pequeña escala se realizó de la misma forma pero ajustando los volúmenes a un cultivo inicial de 50ml.

Para enviarlo al servicio de espectrometría de masas se realizó sobre las bolitas de Estreptavidina en Buffer 10 sin eluir, tres digestiones independientes. Se añadió 0,25 µgr de las proteasas indicadas a continuación en un volumen final de aproximadamente 15 µl de bolitas estreptavidina.

1. Digestión con tripsina.
2. Digestión con Endoproteinasa LysC con SDS 0,1%. Tras la incubación se filtró la muestra con unas puntas mediante cromatografía de interacción hidrofílica (Top Tip polyLC TT200HEA) para eliminar el detergente siguiendo la recomendación del fabricante.
3. Digestión con tripsina y con el detergente Invitrosol® compatible con la EM.

Las muestras se incubaron toda la noche a 37°C y posteriormente se enviaron al servicio de espectrometría de masas dotado de una trampa iónica LC-MS/MS (*Finnigan LTQ Orbitrap*) del Biozentrum (Universidad de Basilea). Los péptidos fueron identificados y analizados utilizando el software *Phenyx* (Geneva Bioinformatics) y *Mascot*.

6.8 Ensayo de dos híbridos

Para determinar la interacción entre dos proteínas se utilizó el ensayo de doble híbrido. Se cotransformó la cepa de *S. cerevisiae* Y190 con los plásmidos pAS2 y pACT2 (Harper et al., 1993) conteniendo cada uno de ellos la ORF, completa o parcial, de las proteínas de interés. Las proteínas expresadas desde el pAS2 llevan asociado el dominio de unión a ADN del gen *GAL4* y las del pACT2 el dominio de activación transcripcional de dicho gen, de tal forma que si ambas proteínas interaccionan se activa la transcripción del gen *GAL4* y se puede detectar mediante el ensayo de la β-galactosidasa.

Ensayo β-galactosidasa cuantitativo

Se recogió un cultivo de 50 ml de células en fase logarítmica (DO₆₀₀ 1), se lavó una vez con agua y se resuspendieron las células en 250 µl de “Breaking Buffer” (100mM Tris-HCl pH 8.0, Glicerol 20%, 1mM β-mercaptoetanol) conteniendo 12.5µl de PMSF 40 mM. Se rompieron las células como ya se ha descrito en el Apartado 6.1, se añadió 250 µl más de “Breaking Buffer” y el lisado se centrifugó 15 minutos a 500g en frío. Se cuantificó la cantidad de proteína de las muestras mediante el ensayo de Bradford.

A continuación se mezcló, en tubos de vidrio, los extractos con Buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, 1 mM MgSO₄, pH 7.0) de la siguiente forma:

- 50µl extractos + 950 µl de Buffer Z
- 100µl extractos + 900 µl de Buffer Z

Las muestras se incubaron a 28°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadió 200µl de ONPG (4 mg/ml en Buffer Z) (*Sigma*). Se empezó a contar el tiempo hasta la detección de un color amarillo pálido, momento en que se detiene la reacción al añadir 500µl de Na₂CO₃ 1M fresco. Se midió la DO a 420 nm de cada muestra. Las unidades de β-galactosidasa representan: Abs DO₄₂₀ por minuto de reacción por mg de proteína total.

Ensayo β-galactosidasa cualitativo (Método de Filtros)

Se adhirió un filtro de nitrocelulosa directamente sobre la placa con colonias de Y190 transformadas con pAS2 y pACT2, o bien sobre “patch” de una mezcla de varios clones, y se sumergió en Nitrogeno líquido durante unos segundos. Este filtro, con las células hacia arriba, se colocó sobre un papel 3MM Whatman empapado en BufferZ + X-Gal (1µgr/ml). A continuación se incubó a 37°C y se fue observando cada hora hasta detectar una tonalidad azul.

OBJETIVOS



OBJETIVOS

Hasta la realización de este trabajo, la regulación de la actividad QSIII en la membrana había sido muy poco caracterizada. Se desconocía tanto el mecanismo general de activación como el efecto directo de Chs4p, su hipotético activador, sobre la subunidad catalítica de la actividad QSIII. Por todo ello, este trabajo se propuso como objetivo principal, esclarecer el papel Chs4p en la regulación de la actividad QSIII.

Paralelamente, se planteó un segundo objetivo, cuyo propósito era determinar los posibles elementos específicos que participan en la regulación de la actividad QSIII durante el proceso de conjugación.

Ambos objetivos están integrados 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*, y por tanto, posible diana en el desarrollo de antifúngicos.

RESULTADOS



1. Chs4p ES NECESARIA PARA LA CORRECTA TRANSLOCACIÓN DE Chs3p EN LA MP

1.1 Caracterización de las proteínas Chs3p y Chs4p

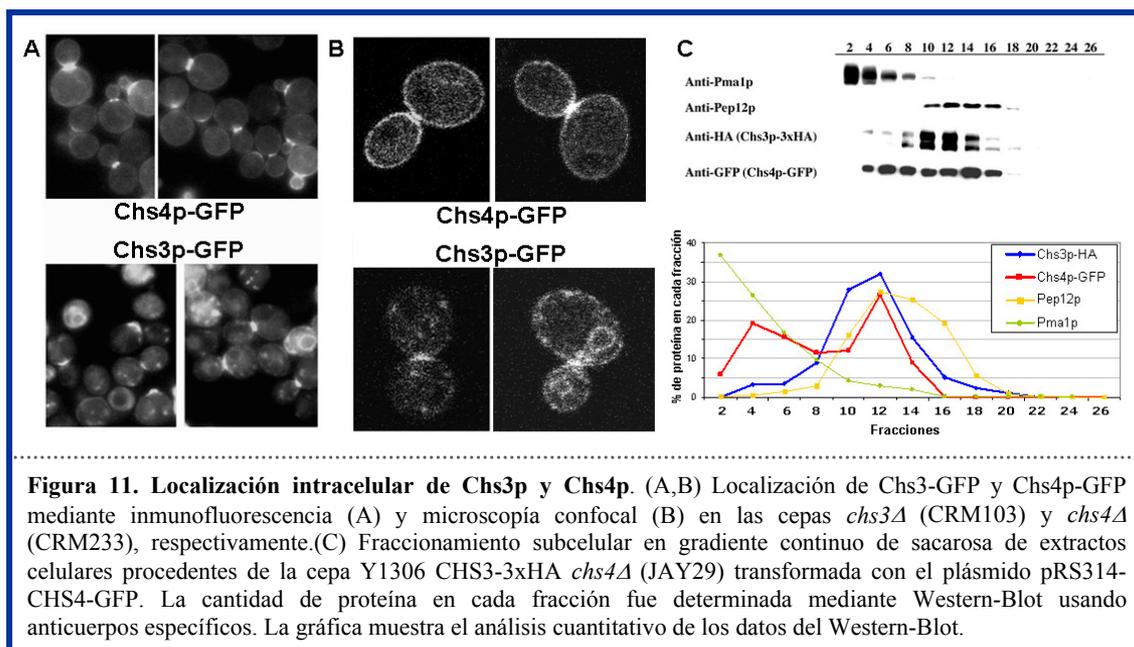
La síntesis de quitina está estrictamente controlada a lo largo del ciclo celular y esto se consigue mayoritariamente a través de la regulación postraduccional de la actividad QSIII. Chs3p es una proteína con una regulación transcripcional poco marcada, observándose un ligero pico de expresión en la transición G1/S (Igual et al., 1996; Pammer et al., 1992). Sin embargo, los niveles de proteína se mantienen constantes a lo largo del ciclo celular y la vida media de la proteína es muy larga (Ziman et al., 1996). La sobreexpresión de *CHS3* no produce ni un incremento en la síntesis de quitina ni en la actividad QSIII, sin embargo, el incremento de Chs4p aumenta la actividad QSIII sin modificar los niveles de Chs3p. Todo esto sugería que Chs4p es un factor limitante que regula postraduccionalmente la actividad QSIII. Resumiendo, Chs4p presenta dos funciones en cuanto a la regulación de la actividad QSIII; por un lado es necesaria para la activación de la actividad QSIII y por tanto para la síntesis de quitina, y por otro es esencial para la correcta localización de Chs3p en la zona del cuello, como ya se había descrito (DeMarini et al., 1997; Sanz et al., 2004). Como el mutante *chs4Δ* presenta una actividad QSIII zimogénica, varios grupos han propuesto una activación proteolítica de Chs3p mediada por Chs4p. Sin embargo, ninguno de los datos experimentales obtenidos hasta la fecha apoya esta hipótesis, y todo apunta a que la regulación debe ser mediante otro mecanismo.

Hasta la realización de este trabajo se desconocía el papel específico de Chs4p en la activación de la actividad QSIII. Por lo tanto, nos propusimos caracterizar el complejo Chs3p/4p y su mecanismo molecular de activación.

1.1.1 Localización intracelular de Chs3p y Chs4p

En *S. cerevisiae*, se ha descrito que Chs3p y Chs4p colocalizan a nivel del cuello. Chs4p, gracias a su unión al anillo de septinas a través de Bni4p, determina la localización de Chs3p en el cuello, al mismo tiempo que induce la activación catalítica de la actividad QSIII (DeMarini et al., 1997; Trilla et al., 1997).

Para realizar un análisis más detallado de las localizaciones de Chs3p y Chs4p, procedimos a fusionar ambas proteínas a la proteína fluorescente verde (GFP). Estas construcciones se hicieron en plásmidos centroméricos y bajo el control de su propio promotor. Cada construcción se transformó en su mutante correspondiente, es decir *chs3Δ* o *chs4Δ*, a fin de evitar la posible interferencia de la copia silvestre. En ambos casos se vio que las construcciones eran funcionales porque restauraban la síntesis de quitina en el mutante. Al observar estas células al microscopio de fluorescencia, se vio que ambas proteínas



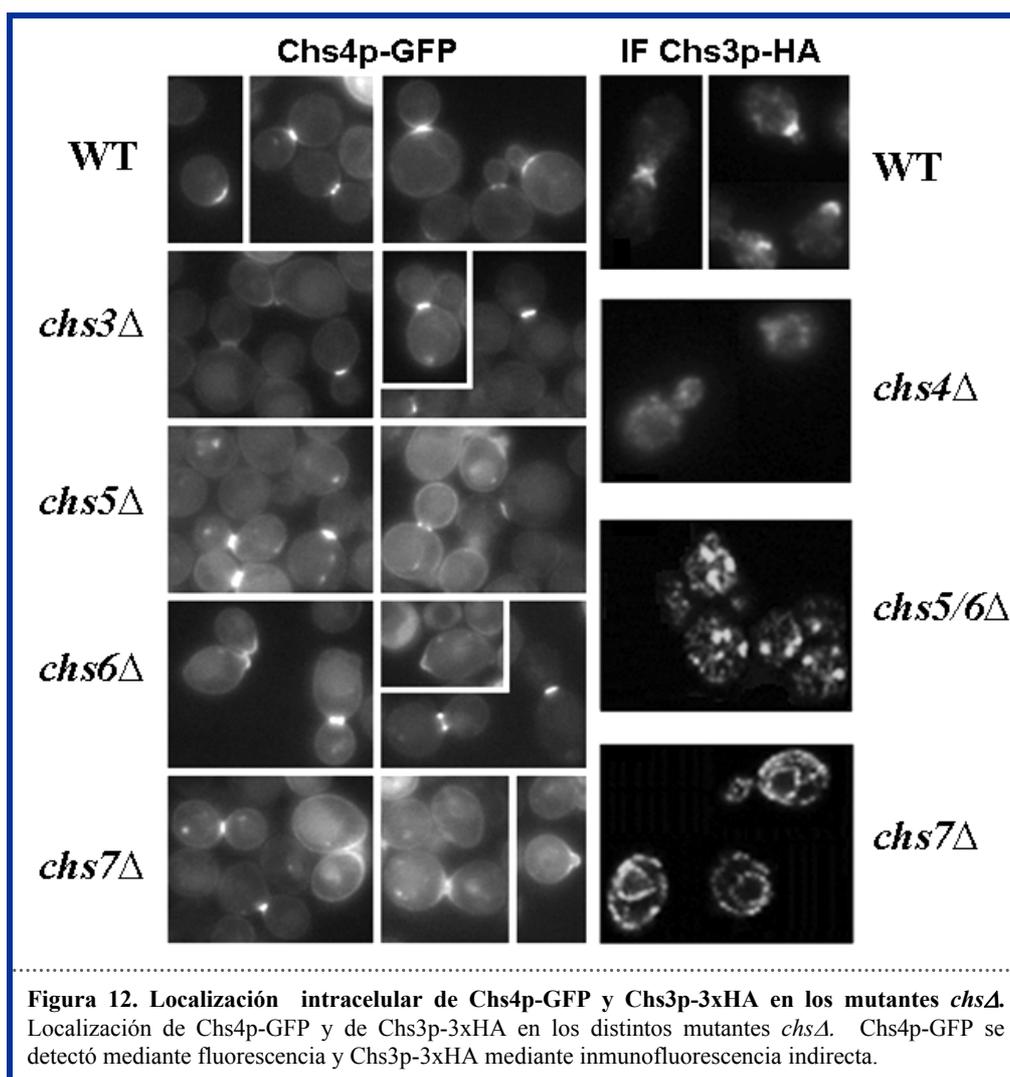
colocalizaban sólo parcialmente (**Figura 11A**). Chs4p-GFP se localizaba tanto en la MP del septo como por toda la superficie celular. Sin embargo, Chs3p-GFP se presentaba únicamente a nivel del septo y estaba ausente en la MP de las paredes laterales. Este resultado se confirmó usando microscopía confocal (**Figura 11B**), Chs4p-GFP se distribuía por toda la MP con especial acumulación en el cuello y Chs3p sólo se encontraba en la región del septo y en vesículas intracelulares, previamente descritas como quitosomas (Ziman et al., 1996). En algunos casos, se podía ver que Chs3p-GFP presentaba una distribución irregular asociada a la membrana debido a su acumulación artefactual en el RE .

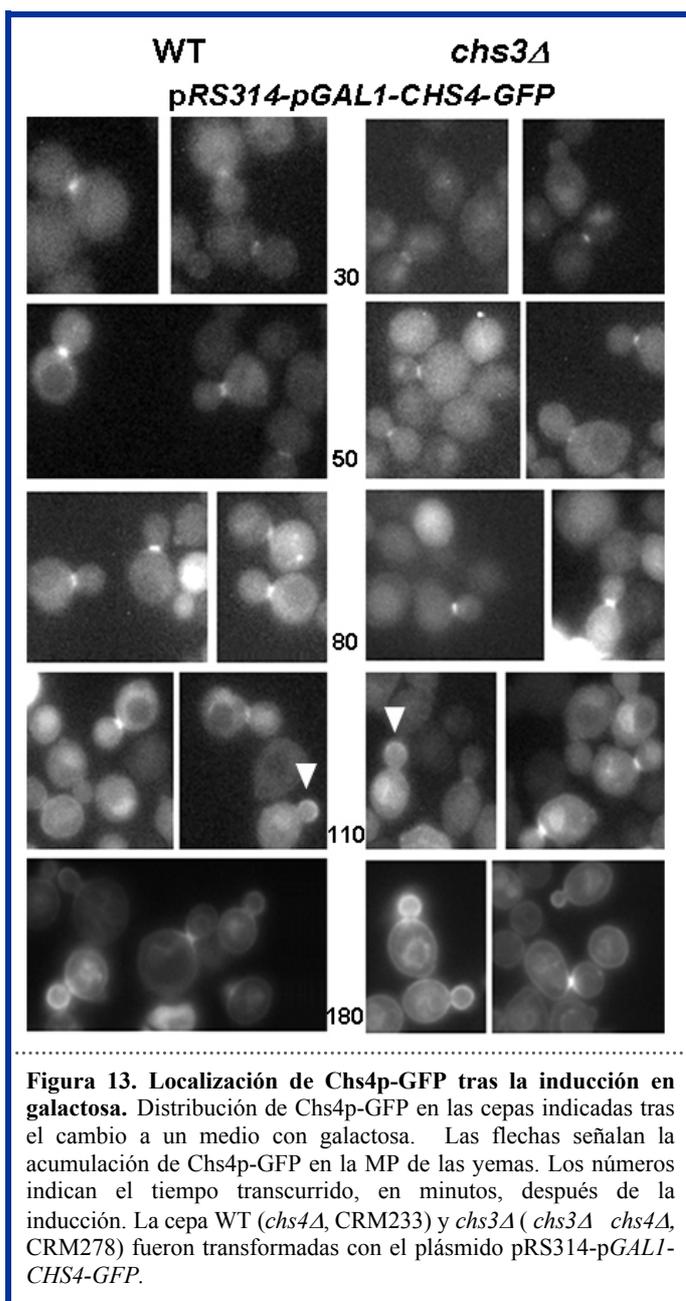
Confirmamos estos resultados usando fraccionamientos subcelulares en gradiente continuo de sacarosa. Para ello, usamos el mutante doble *chs3Δ chs4Δ* transformado con dos plásmidos que contenían Chs3p-3xHA y Chs4p-GFP. De esta forma cada proteína se detectó en un mismo gradiente usando los anticuerpos anti-HA y anti-GFP. Chs3p-3xHA se localizaba mayoritariamente en un conjunto de vesículas intracelulares parcialmente coincidentes con el marcador de endosomas tardíos Pep12p (**Figura 11C**). Sólo una pequeña parte de Chs3p se encontraba en las fracciones de MP (representadas por Pma1p), como ya se había descrito anteriormente (Santos & Snyder, 1997). Chs4p-GFP presentaba dos picos a lo largo de todo el gradiente. Uno de ellos coincidía con la MP y el resto se localizaba en vesículas intracelulares con una densidad similar a la de Chs3p. Sin embargo, hemos sido incapaces de ver la localización de las vesículas que contienen Chs4p mediante fluorescencia *in vivo* (**Figura 11**) o inmunofluorescencia indirecta (Datos no mostrados). Ni Chs3p ni Chs4p se detectaron en las fracciones más ligeras del gradiente, lo que demuestra que ambas proteínas se mantienen asociadas a membrana durante todo su transporte. Con estos perfiles podemos deducir que una parte importante de Chs4p está asociada a la MP independientemente de Chs3p, y por tanto, la cantidad de proteína que está interaccionando a nivel del cuello es limitada.

1.1.2 Transporte intracelular de Chs4p

La distribución de Chs4p en el gradiente indica que hay una parte significativa de esta proteína que se encuentra en vesículas. Sin embargo, se desconocía todo acerca del transporte intracelular de Chs4p. Para estudiarlo, analizamos la localización de Chs4p-GFP en los diferentes mutantes *chsΔ* para ver si, al igual que ocurre con Chs3p, quedaba retenida en los diferentes compartimentos celulares (ver introducción). En todos los mutantes *chsΔ*, Chs4p llega a la MP y se presenta correctamente localizada (**Figura 12**). Esto indicaba que Chs4p posee sus propias señales para alcanzar la MP, y que es transportada independientemente de Chs3p y de toda la maquinaria implicada en el transporte intracelular de la QSIII. Incluso su transporte es independiente de Chs5p, que participa en el transporte post-Golgi de varias proteínas. Este resultado sugiere que Chs4p es transportada en vesículas diferentes a las de Chs3p.

Para analizar con más detalle el tráfico intracelular de Chs4p se reguló la expresión del gen mediante el promotor *GAL1* inducible por galactosa (pRS314-*GAL1-CHS4-GFP*). Tras la





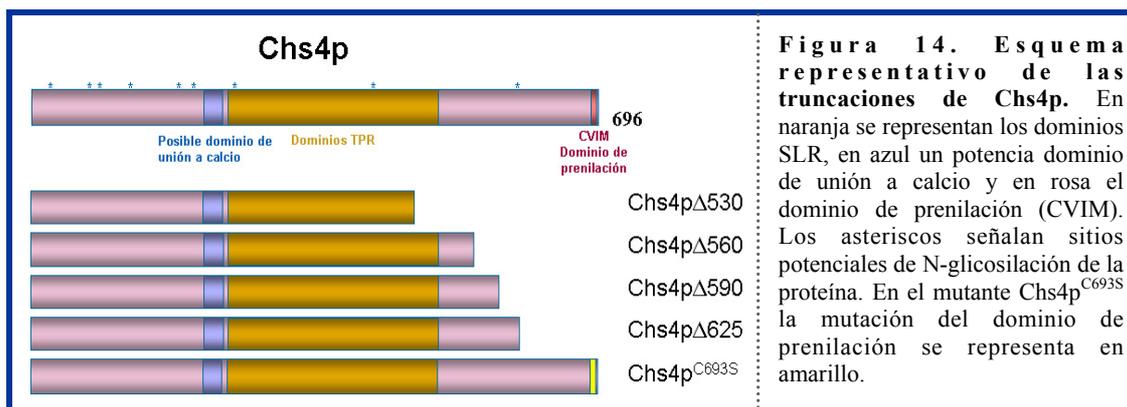
inducción con galactosa, se analizó la señal de fluorescencia a diferentes tiempos. Como se puede ver en la **Figura 13**, a tiempos cortos de inducción con galactosa, Chs4p-GFP sólo se detecta a nivel del cuello, aumentando en intensidad a lo largo del tiempo. A los 110 minutos comienza a detectarse una débil señal en la MP de algunas yemas pequeñas. Solamente a partir de 3 horas de inducción, Chs4p-GFP se acumula significativamente por toda la MP. Este mismo patrón también se observó en los mutantes *chs3Δ*. Por tanto, Chs4p es una proteína con un transporte polarizado hacia el septo e independiente de Chs3p.

Para corroborar este resultado se analizó la localización de Chs4p-GFP en varios mutantes termosensibles bloqueados en la secreción: *sec6-4*, *sec7-1* y *sec16-2*, afectados en la fusión de vesículas a MP, la fusión de COPII a Golgi y en la salida del RE, respectivamente.

En todos los casos, tras la incubación a temperatura restrictiva, disminuía significativamente la acumulación de Chs4p en el cuello (Datos no mostrados). Por lo que Chs4p depende de la maquinaria de secreción general para su correcta polarización hasta la zona del septo, pero no así de la maquinaria específica implicada en el transporte de la QSIII.

1.1.3 Deleción de la región carboxilo terminal de Chs4p

Los resultados obtenidos indicaban que Chs4p está asociada a membranas. Esta proteína de 696 aminoácidos carece de dominios transmembrana, pero sí que contiene un dominio de prenilación (CVIM) cerca del extremo C-terminal, que es receptor de un grupo



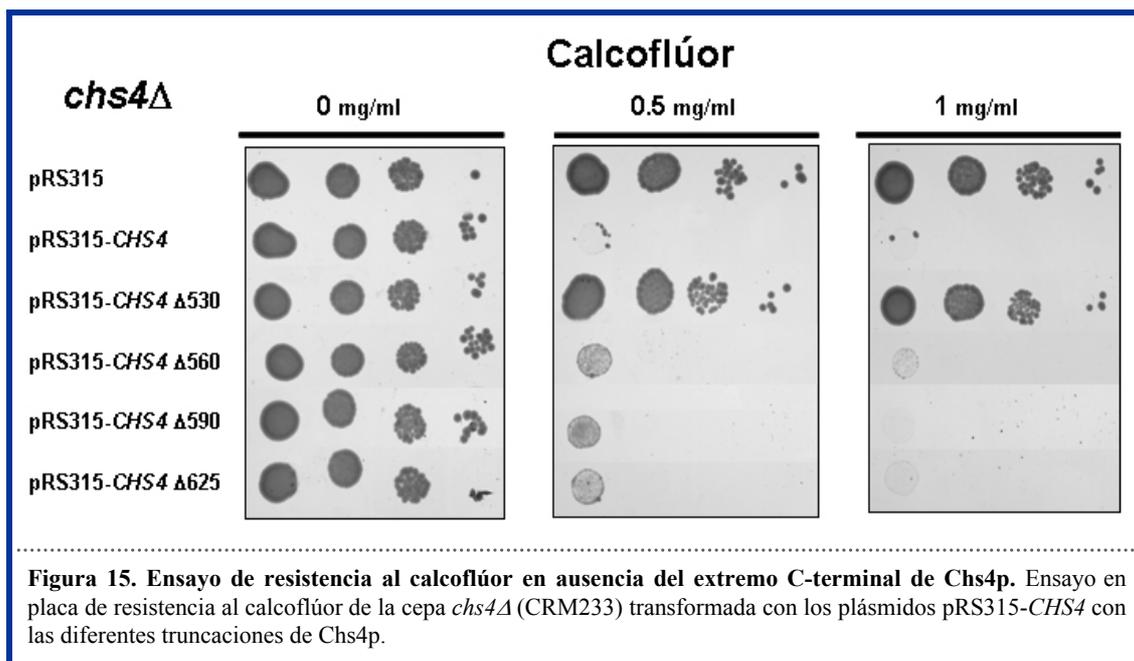
prenilo *in vivo* (Grabinska et al., 2007). Sin embargo, se ha descrito que este dominio es prescindible para la función de Chs4p (DeMarini et al., 1997; Ono et al., 2000; Trilla et al., 1997).

Con el fin de analizar la asociación de Chs4p a la membrana construimos una serie de mutantes delecionados en su extremo C-terminal. Las distintas truncaciones de Chs4p se hicieron sobre un plásmido centromérico que contiene *CHS4* regulado bajo su propio promotor. Para evitar la formación de un mRNA de longitud más corta, se introdujo por mutagénesis dirigida un codón de parada en la cadena codificante. Todas las truncaciones, salvo la Chs4pΔ530, se hicieron posteriores a los dominios SLR, región esencial en la función de Chs4p (Ono et al., 2000). De esta forma se obtuvieron varias proteínas truncadas de Chs4p, denominadas Chs4pΔ530, Chs4pΔ560, Chs4pΔ590 y Chs4pΔ625, las cuales carecían de los últimos 166, 136, 106 y 71 aminoácidos respectivamente. Asimismo, se cambió el dominio de prenilación de Chs4p (CVIM), mutando la cisteína 693 aceptora del grupo prenilo, por una serina. A este mutante se le denominó Chs4p^{C693S} (**Figura 14**). Todas las construcciones se comprobaron mediante análisis de restricción y secuenciación.

Una vez transformados en la cepa *chs4Δ*, se comprobó que todas las proteínas mutantes, salvo la construcción Chs4pΔ530, complementaban el fenotipo de sensibilidad al calcoflúor (**Figura 15**).

La proteína Chs4pΔ530 se acumula a bajos niveles en la célula, lo que explica su falta de complementación (**Figura 15**). La sobreexpresión aumenta el grado de complementación, pero produce una deslocalización de la quitina (no mostrado), indicando que la región comprendida entre el aminoácido 530 y 560 es esencial para la funcionalidad de Chs4p.

El resto de proteínas truncadas, Chs4pΔ560, Chs4pΔ590 y Chs4pΔ625, así como el mutante en el dominio de prenilación, Chs4p^{C693S}, presentaban un comportamiento similar a la proteína completa. Los niveles de estas proteínas en la célula eran muy similares a los silvestres. Todas interaccionaban tanto con Chs3p como con Bni4p en un ensayo de dos



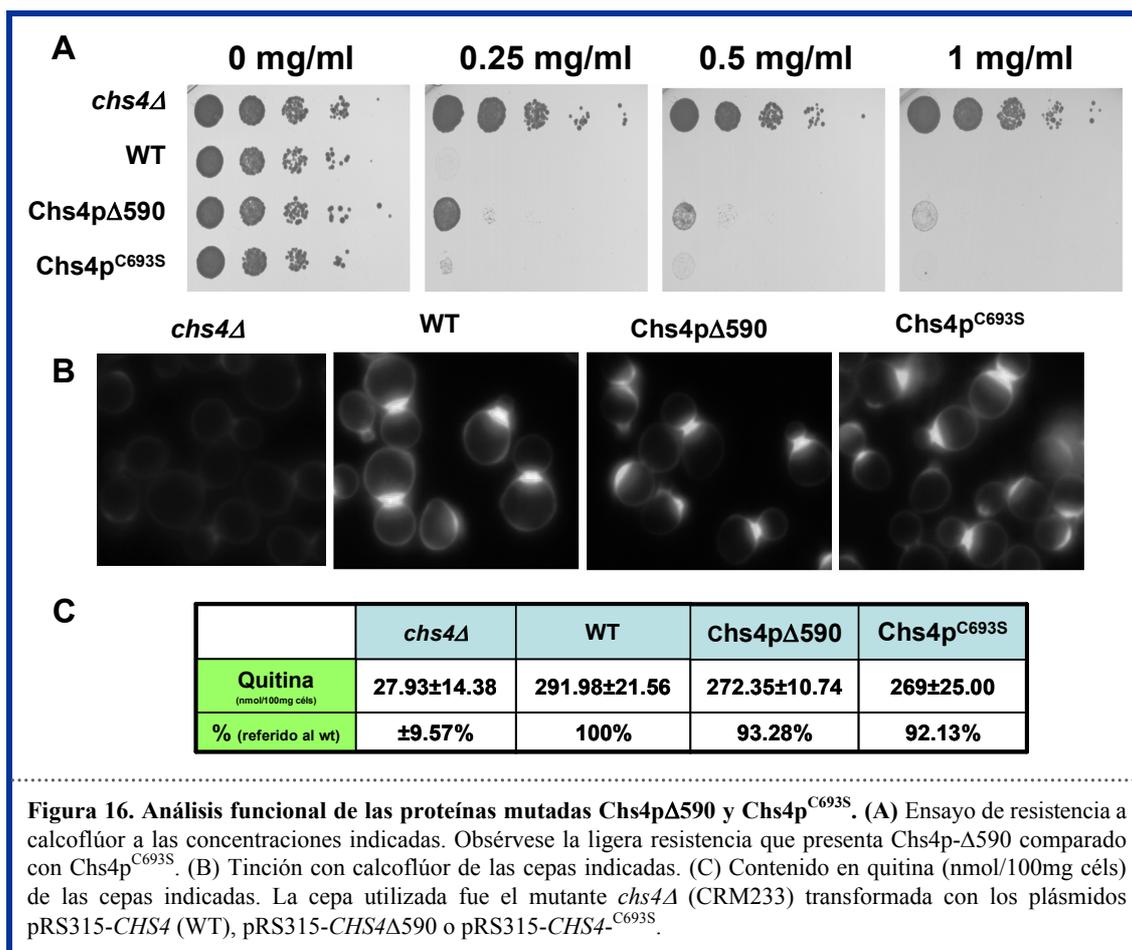
híbridos y además presentaban la misma localización de quitina al teñir con calcoflúor. Con el fin de facilitar el análisis, y como todas las truncaciones tenían un fenotipo bastante parecido, decidimos continuar el estudio con las proteínas Chs4p^{C693S} y Chs4pΔ590.

Mediante un ensayo de valoración de quitina se observó que las cepas Chs4pΔ590 y Chs4p^{C693S} tienen unos niveles de quitina muy parecidos a la cepa silvestre (**Figura 16**), y comprobamos que en ambos casos la localización de Chs3p-GFP era la correcta.

Una característica importante de estas proteínas mutadas es su localización. Chs4pΔ590-GFP y Chs4p^{C693S}-GFP se encuentran en el septo pero están ausentes en la MP lateral (**Figura 17**). El mismo resultado se obtuvo mediante fraccionamientos subcelulares en gradientes, en los que ni Chs4pΔ590-3xHA ni Chs4p^{C693S}-3xHA aparecían asociadas las fracciones de MP. Estos resultados confirman que el grupo prenilo media la asociación de Chs4p a la MP aunque es prescindible para su función.

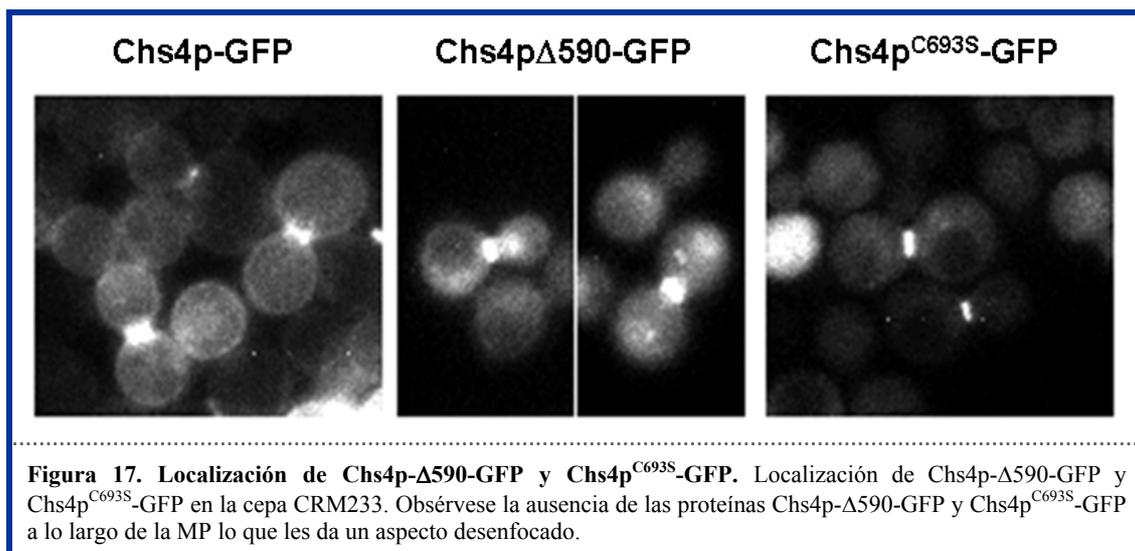
La ausencia de Chs4pΔ590 y Chs4p^{C693S} en la MP lateral de la célula nos planteó la posibilidad de que estas cepas presentaran defectos en sus paredes laterales, ya sea en la síntesis de quitina o en el ensamblaje de la pared. Para ver si la delección del extremo C-terminal produce una disminución de la quitina lateral, se procedió a la tinción con WGA-FITC. Este compuesto es una lectina que se une específicamente a residuos de N-acetil-D-glucosamina conjugada con el fluorocromo FITC (fluoresceína-5-isotiocianato). La tinción no mostraba ninguna diferencia entre las cepas que contenían las proteínas mutantes con respecto a la proteína completa (Datos no mostrado).

Aun así, intentamos ver si existía algún defecto en el ensamblaje de la pared celular y para ello analizamos la sensibilidad/resistencia a varios compuestos que afectan a la pared



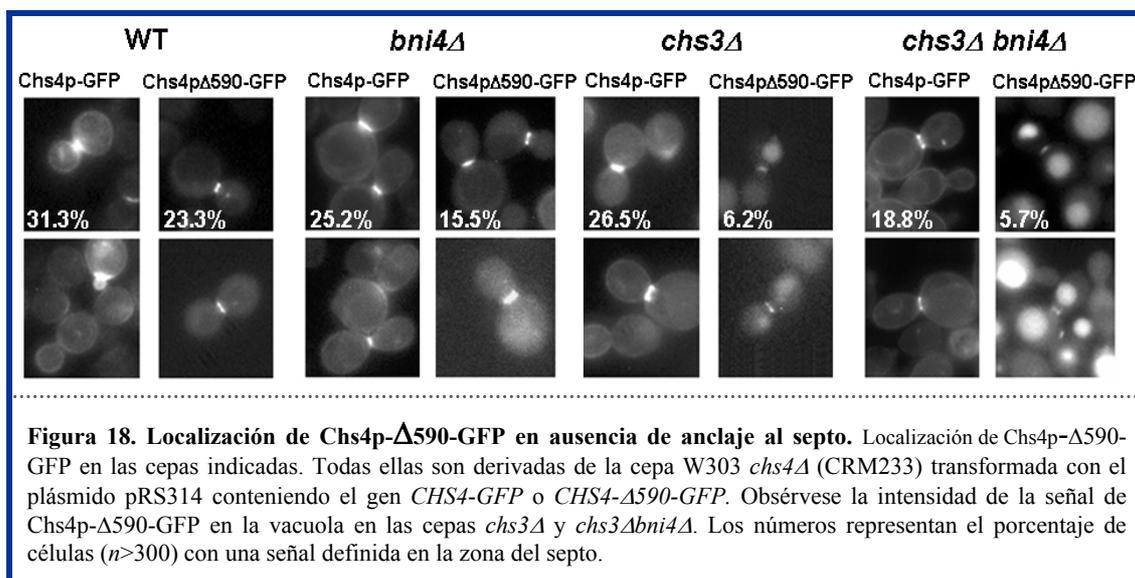
celular como son: calcoflúor, SDS, cafeína y zimoliasa. No se vio ninguna diferencia entre la cepa silvestre y las Chs4pΔ590 o Chs4p^{C693S} (Datos no mostrado). En el caso del calcoflúor, se detectó una pequeña resistencia en la cepa Chs4p^{C693S} que era un poco más acusada en el caso del Chs4pΔ590 (Figura 16). Esto se podría atribuir a la bajada del 10% en el contenido de quitina de estas cepas. Este dato también sugiere que el extremo C-terminal posee funciones adicionales más allá de la mera prenilación. En resumen, puede decirse que estas cepas no presentan ningún defecto aparente en la organización de la PC.

Aunque Chs4pΔ590 no se distribuye a lo largo de la MP, sí que mantiene su localización en el cuello (Figura 17). Esta proteína interacciona con Chs3p y con Bni4p, así que es probable que sea su unión a ellas lo que determina su anclaje en la zona del septo. Para comprobarlo, decidimos estudiar la localización de Chs4pΔ590-GFP en ausencia de Chs3p y/o Bni4p (Figura 18). En los mutantes simples *bni4Δ* y *chs3Δ*, apenas se altera la localización de Chs4p-GFP en el cuello (Sanz et al., 2004). En el caso de Chs4pΔ590-GFP se puede observar que mientras en *bni4Δ* el porcentaje de células con señal en el cuello es bastante similar a la cepa silvestre, en el mutante simple *chs3Δ* o el doble *bni4Δ chs3Δ* la acumulación de Chs4pΔ590-GFP en el cuello se reduce drásticamente. Cuando se compara la localización de la Chs4p-GFP con la Chs4pΔ590-GFP en el mutante doble *bni4Δ chs3Δ*, vemos que la eliminación del



extremo C-terminal provoca una disminución de su localización en el cuello hasta la tercera parte. Asimismo, en este mutante doble, la Chs4pΔ590-GFP se acumula en la vacuola, lo que sugiere una degradación de la proteína. Mediante un ensayo de Western-blot se confirmó que los niveles de Chs4pΔ590-3xHA en *bni4Δ chs3Δ* se reducían hasta el 25% con respecto al silvestre (Datos no mostrados). Estos resultados subrayan la importancia de la interacción de Chs4p con otras proteínas.

Para corroborar estos resultados, analizamos la asociación a membranas de Chs4p-3xHA y Chs4pΔ590-3xHA en fraccionamientos subcelulares simples. Se trataron los extractos celulares totales con Urea al 4%, para extraer las proteínas de las membranas, o con agua como control, y se centrifugaron a 120.000 g. De esta forma se obtiene el sobrenadante (So), conteniendo extractos proteicos solubles y el pellet (Po), donde han precipitado todas las membranas celulares y las proteínas asociadas a ellas. Chs4p-3xHA se encontró



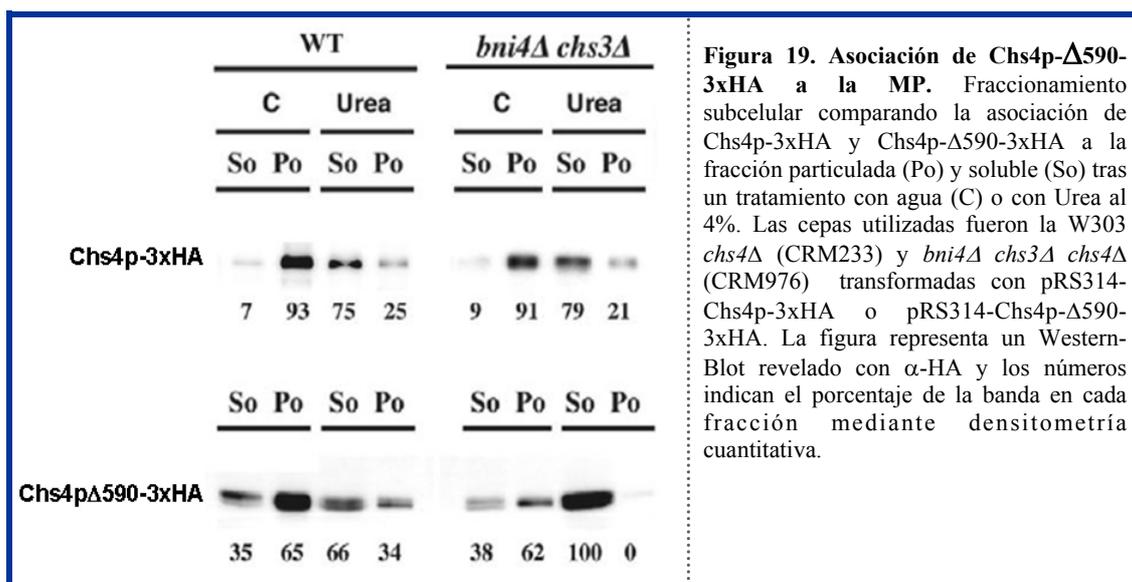


Figura 19. Asociación de Chs4p-Δ590-3xHA a la MP. Fraccionamiento subcelular comparando la asociación de Chs4p-3xHA y Chs4p-Δ590-3xHA a la fracción particulada (Po) y soluble (So) tras un tratamiento con agua (C) o con Urea al 4%. Las cepas utilizadas fueron la W303 *chs4Δ* (CRM233) y *bni4Δ chs3Δ chs4Δ* (CRM976) transformadas con pRS314-Chs4p-3xHA o pRS314-Chs4p-Δ590-3xHA. La figura representa un Western-Blot revelado con α-HA y los números indican el porcentaje de la banda en cada fracción mediante densitometría cuantitativa.

mayoritariamente asociada a la fracción particulada (Po), aunque una parte significativa de la proteína pasaba al sobrenadante (So) tras el tratamiento con Urea (**Figura 19**). Similares resultados se obtuvieron en el doble mutante *bni4Δ chs3Δ*. Por el contrario, la proteína Chs4pΔ590-3xHA mostraba un comportamiento bastante diferente. En muestras sin tratar, una fracción importante de la proteína se encontraba en el sobrenadante de la cepa silvestre. Esta relación no variaba en ausencia de Bni4p y Chs3p. Sin embargo, mientras que el tratamiento con Urea en la cepa silvestre no extraía más Chs4pΔ590-3xHA al sobrenadante, en el mutante doble *bni4Δ chs3Δ*, prácticamente la totalidad de la proteína se solubilizaba.

Todos estos datos señalan que la región C-terminal de Chs4p está directamente implicada en su asociación a la MP. Parece que el anclaje de Chs4p a la MP del septo se debe a una función cooperativa entre su dominio de prenilación y su interacción con Chs3p, y en menor medida con la proteína Bni4p. En ausencia del dominio de prenilación, Chs4p seguiría siendo funcional debido a su interacción directa con Chs3p.

1.1.4 Mutantes puntuales de Chs4p

La región central de la proteína Chs4p, entre el aminoácido 445 y 563 y que abarca prácticamente todos los dominios SLR, es esencial para la funcionalidad de la proteína. Esta zona interviene en la interacción con Chs3p, determinando su correcta localización y activación (Ono et al., 2000). Para intentar separar el papel de esta región en ambas funciones, realizamos una mutagénesis mediante PCR de saturación en la región central de *CHS4* y analizamos los mutantes obtenidos.

Estos mutantes de Chs4p se obtuvieron por PCR degenerada usando dos oligos que flanqueaban la secuencia codificante de los dominios SLR, entre los aminoácidos 280 y 564. Dentro de esta región, se incluye la zona más conservada de Chs4p, que presenta una identidad

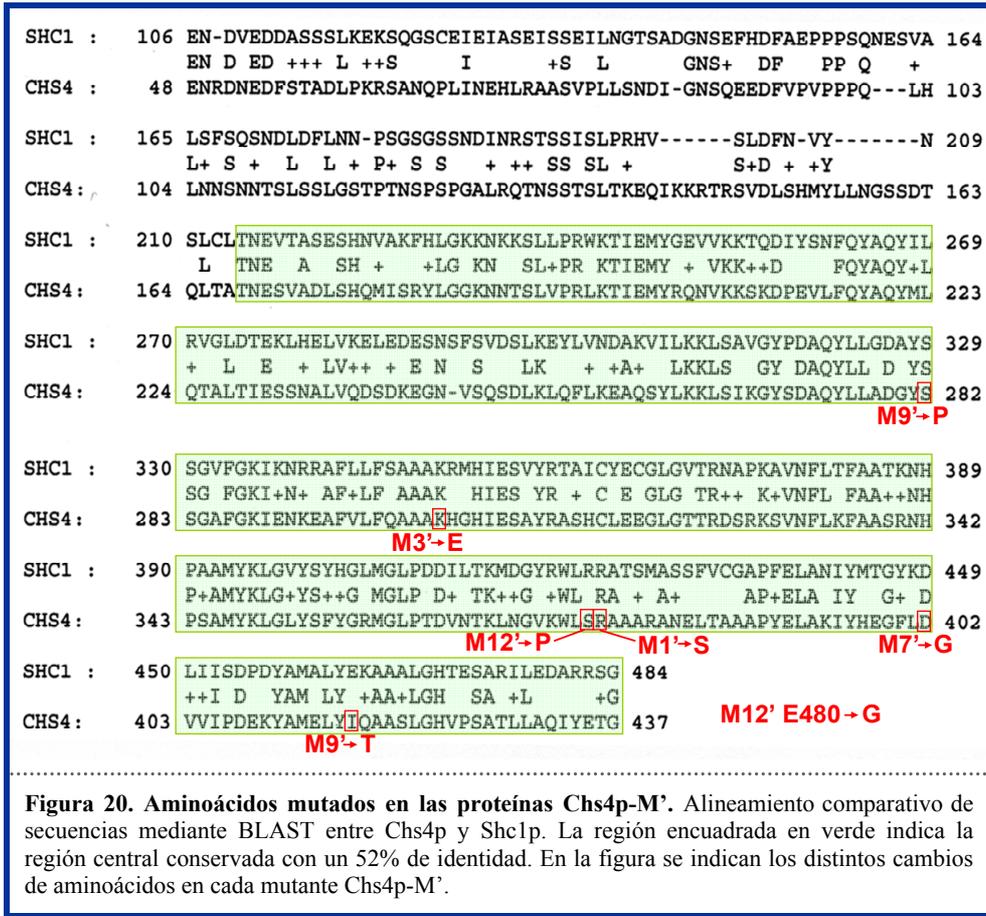


Figura 20. Aminoácidos mutados en las proteínas Chs4p-M'. Alineamiento comparativo de secuencias mediante BLAST entre Chs4p y Shc1p. La región encuadrada en verde indica la región central conservada con un 52% de identidad. En la figura se indican los distintos cambios de aminoácidos en cada mutante Chs4p-M'.

del 52% con Shc1p (Sanz et al., 2002).

Los mutantes se seleccionaron cotransformando una cepa *chs4Δ* con las secuencias amplificadas degenerantes y con un plásmido de Chs4p-GFP, linearizado en la secuencia a reemplazar. La recombinación *in vivo*, sustituye la secuencia original por las variedades mutadas permitiendo la recircularización del plásmido. Este sistema mostró una alta eficiencia (>90%). En primer lugar, se seleccionaron los clones que no eran completamente funcionales al mostrar resistencia total o parcial al antifúngico calcoflúor. Entre los 371 clones, sólo 26 de ellos mostraban resistencia al antifúngico (datos totales de dos experimentos independientes). Entre estos 26 clones se seleccionaron 17, los cuales presentaban Chs4p*-GFP correctamente localizada en la zona del septo. Posteriormente, se secuenció la zona mutagenizada y, para simplificar el análisis, se eligieron aquellos clones que presentaban solamente una o dos mutaciones puntuales. Se denominaron M1', M3', M7', M9' y M12'.

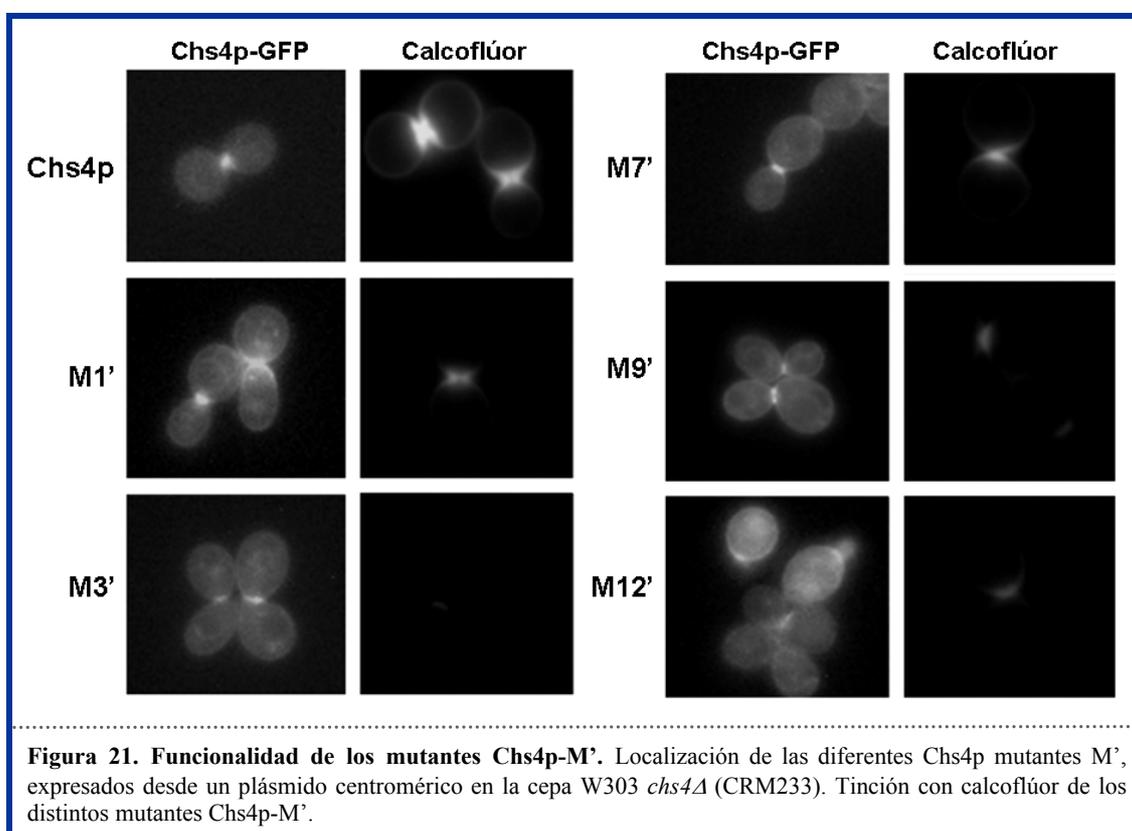
Los clones M1', M3' y M7' presentaban una sola mutación puntual, mientras que los M9' y M12' contenían dos. En la Figura 20 se muestran los cambios de aminoácidos y la posición de cada uno de ellos. La mayoría de los cambios se encontraban dentro de la región más conservada de Chs4p. En un análisis más detallado de la localización de los mutantes con la GFP, observamos que todos se localizaban correctamente en el septo (Figura 21). Sin

embargo, el mutante M9' y el M12' mostraban menos intensidad de fluorescencia en el septo, aunque ambas proteínas se acumulaban en la célula en una cantidad similar a la silvestre.

Al teñir las correspondientes cepas con calcoflúor, se observó que todas mostraban menos intensidad que un silvestre (**Figura 21**) de acuerdo con la resistencia al calcoflúor observado. De hecho, el mutante M3' prácticamente no mostraba tinción, similar a lo que ocurre en los mutantes *chs4Δ*. La poca cantidad de quitina de estos mutantes parecía bien localizada, ya que en ningún caso se detectó una distribución aberrante.

Para corroborar estos resultados realizamos una valoración de la cantidad de quitina, y como se puede ver en la **Tabla 7** todos los clones presentaban niveles reducidos de quitina y especialmente el M3', con unos niveles similares al mutante *chs4Δ*. Las cantidades de quitina se correspondían con los niveles de resistencia obtenidos en placas con calcoflúor.

A continuación determinamos la interacción de estas proteínas mutadas con Chs3p mediante un ensayo de dos híbridos utilizando el extremo amino de Chs3p (Chs3p Δ 700), ya que con la proteína completa no se detecta la interacción (DeMarini et al., 1997). Como se puede ver en la **Tabla 7**, los mutantes M1', M3' y M7' interaccionaban en mayor o menor medida con Chs3p, sin embargo los mutantes M9' y M12' no presentaban interacción con Chs3p. Este dato explicaría porque los mutantes M9' y M12' no son capaces de activar eficientemente la QSIII y muestran niveles muy reducidos de quitina. El mutante M3' muestra



	Valoración de Quitina (nmoles de NAGlc/100mg cél)	Interacción Chs4p-Chs3Δ700p (Udes de β-galactosidasa referidas al wt)
<i>chs4Δ</i>	23.88 (7.9%)	—
Chs4p	301.02 (100%)	1 (x 5.04)
M1'	138.47 (46%)	0.86 ± 0.39
M3'	31.51 (10.5%)	0.32 ± 0.04
M7'	129.06 (42.9%)	2.1 ± 0.36
M9'	80.23 (26.6%)	0
M12'	72.64 (24.13%)	0

Tabla 7. Caracterización de los mutantes Chs4p-M'. Cantidad de quitina, expresada en nmoles de NAcGln/100mg cél. y porcentaje con respecto a un silvestre, de los diferentes mutantes de Chs4pM'. Las proteínas mutadas de Chs4p fueron expresadas desde un plásmido centromérico en la cepa W303 *chs4Δ* (CRM233). La interacción de Chs4p y Chs3p se cuantificó mediante un ensayo cuantitativo de dos híbridos y se representa en unidades de β-galactosidasa referido a la cepa silvestre.

un fenotipo bastante interesante, ya que siendo capaz de interactuar con Chs3p, aunque sea a niveles más bajos, no induce su activación. Los mutantes M7' y M9' por su parte, son capaces de interactuar correctamente con Chs3p pero no la activan hasta niveles silvestres, como se puede ver por el contenido en quitina.

También, mediante un ensayo de dos híbridos, determinamos la interacción de estas proteínas con Bni4p. En este caso había que utilizar la truncación Chs4p-Δ590 como control positivo del experimento, ya que se había descrito que la proteína completa no muestra interacción con Bni4p (DeMarini et al., 1997 y observaciones en nuestro laboratorio). Los datos obtenidos fueron poco concluyentes por problemas de fondo en los controles y de reproducibilidad. Sin embargo, los resultados sugerían que las proteínas M9' y el M12' eran los únicos que no interactuaban con Bni4p.

En una última aproximación, estudiamos en detalle la localización de Chs3p-GFP en estos mutantes. Para ello, hicimos nuevas construcciones de las proteínas mutantes en un plásmido conteniendo Chs4p-3xHA. Una vez obtenidos todos los plásmidos Chs4p*-3xHA se cotransformaron cada uno de ellos junto con Chs3p-GFP en una cepa *chs3Δ chs4Δ*. Chs3p-GFP se localizaba correctamente en el cuello en los mutantes M1' y M7', sin embargo, en los mutantes M3' y M12' parecía que la señal de Chs3p-GFP en el septo estaba bastante reducida. Tanto en el caso del M3' como del M9' y M12', la escasa interacción con Chs3p explicaría su incapacidad de anclarla adecuadamente a la zona del cuello. Debido a la señal tan escasa y variable de Chs3-GFP, habría que realizar otras aproximaciones para llegar a una conclusión definitiva.

En resumen, podemos clasificar los mutantes según tres patrones diferentes:

- M1' y M7': Interaccionan con Chs3p y la localizan correctamente pero no son capaces de activar la QSIII a niveles silvestres
- M3': Este mutante no es capaz de promover la síntesis de quitina a pesar de que se detecta interacción parcial con Chs3p, una peculiaridad no descrita hasta el momento. Es más, se ha propuesto que incluso una débil interacción entre Chs3p y Chs4p es suficiente para activar la síntesis de quitina (Ono et al., 2000). La interacción entre este mutante y Chs3p parece bastante inestable, ya que Chs3p-GFP no se encuentra bien anclada a la zona del cuello.
- M9' y M12': Las proteínas M9' y M12'-GFP presentan cierta deslocalización con menos intensidad de fluorescencia en la zona del septo. Estos mutantes a pesar de no interaccionar con Chs3p, muestran unos niveles de quitina ligeramente más altos que el mutante *chs4Δ*. Esta falta de interacción se refleja en la pérdida de localización de Chs3p-GFP en el septo.

Estos mutantes aportan una valiosa información sobre el mecanismo de interacción/activación de Chs4p, y aunque corroboran que ambas funciones están estrechamente ligadas, en algunos casos, esta correlación puede verse afectada. El estudio de estos mutantes sugiere que no siempre una interacción entre Chs3p y Chs4p implica una activación, y viceversa. Estos resultados indicarían algún tipo de participación activa de Chs4p en la activación de la QSIII, la cual se vería bloqueada en el mutante M3'.

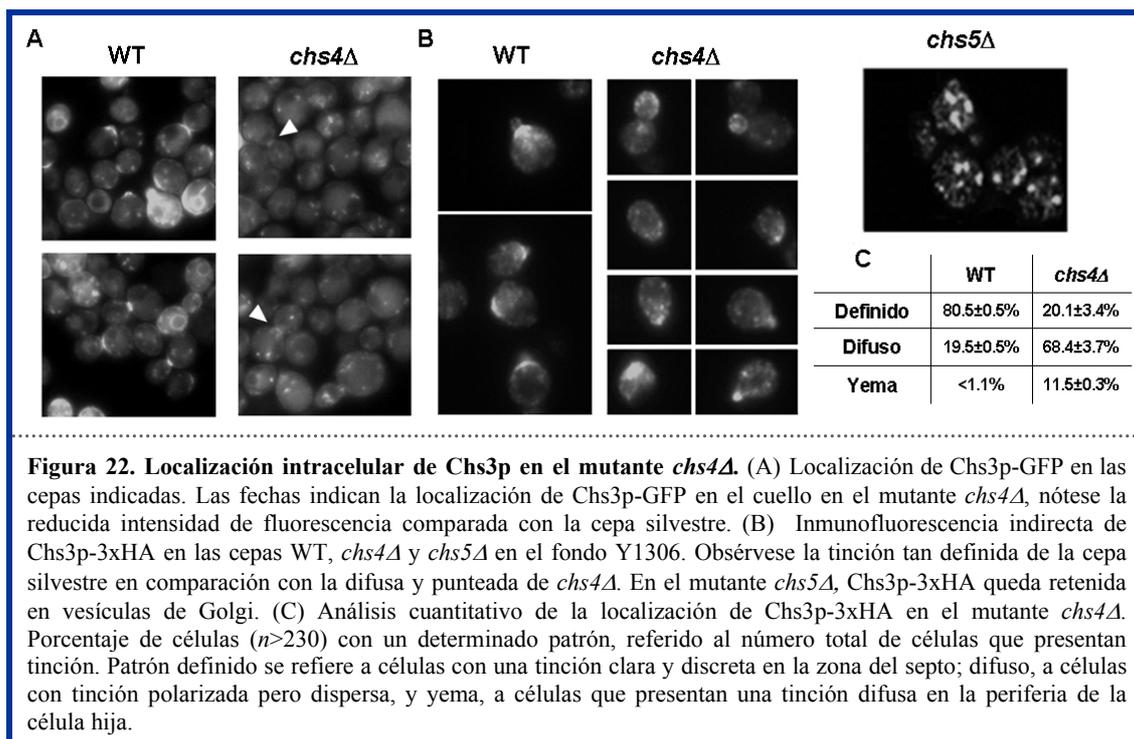
Aunque estas proteínas mutadas de Chs4p no están completamente caracterizadas, nos aportan una serie de ideas y conceptos sobre el mecanismo molecular de interacción y activación entre Chs3p y Chs4p. Y lo que es más importante, constituyen en sí mismos una herramienta de trabajo para el futuro.

1.2 La asociación de Chs3p a la MP depende de Chs4p

Como ya se ha visto, Chs4p se localiza independientemente de Chs3p, lo que planteaba nuevas hipótesis sobre la función de esta proteína. Incluyendo su posible participación en los últimos pasos del transporte de Chs3p, mediando su incorporación a la MP.

1.2.1 Localización de Chs3p en ausencia de Chs4p

Como ya se ha mencionado anteriormente, Chs3p-GFP se localiza en la zona del septo y en puntos intracelulares (Santos & Snyder, 1997; Trautwein et al., 2006). Sin embargo, en el mutante *chs4Δ*, los puntos intracelulares son más intensos y el número de células con señal en el cuello se reduce hasta la quinta parte comparado con el silvestre (**Figura 22A**). La señal de Chs3p-GFP en el cuello no es sólo menos frecuente, sino también menos intensa que en la cepa silvestre.

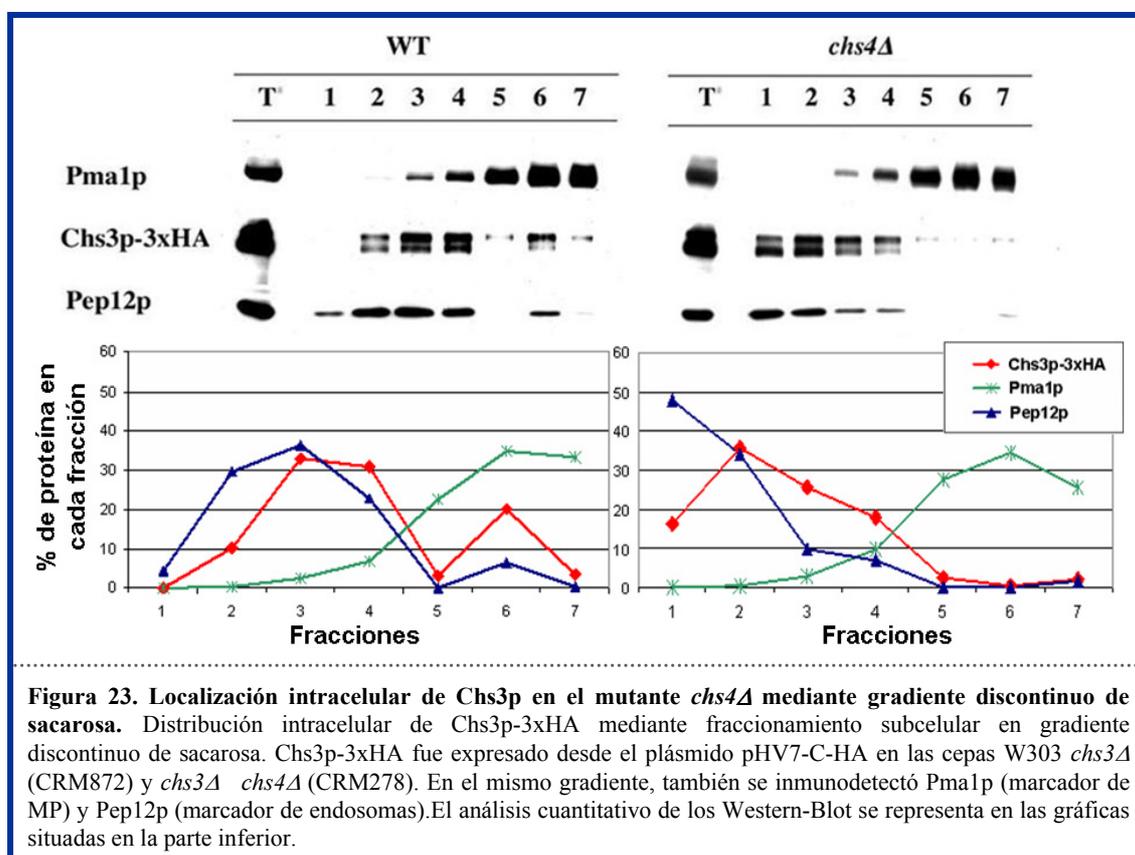


Este resultado contradice de alguna forma a otros autores, que habían descrito la localización difusa de Chs3p en el mutante *chs4Δ* mediante inmunofluorescencia (DeMarini et al., 1997). Para verificar esta discrepancia, realizamos una inmunolocalización de Chs3p-3xHA en una cepa silvestre y en el mutante *chs4Δ*. Como se puede ver en la **Figura 22B**, Chs3p-3xHA mostraba una distribución polarizada, que correspondía con el 15% de las células totales. Sin embargo, mientras que en el silvestre Chs3p se localizaba en una línea bien definida en la zona del cuello, en el mutante *chs4Δ*, el patrón de Chs3p era más bien difuso. Aunque ya se había descrito este fenotipo (DeMarini et al., 1997), nosotros quisimos ir más allá haciendo un análisis cuantitativo del mismo (**Figura 22C**). Los valores obtenidos indicaron que la mayoría de las células con tinción en el silvestre muestran una localización muy definida de Chs3p. En cambio, en el mutante *chs4Δ* este tipo de señal sólo se observa en aproximadamente el 20% de las células, el resto presenta un patrón más bien difuso y poco nítido. Además, en *chs4Δ*, se encuentra con cierta frecuencia tinción en la yema, una localización prácticamente inexistente en la cepa silvestre.

En ausencia de Chs5p, Chs3p presenta un patrón punteado, típico de vesículas de Golgi (Santos & Snyder, 1997). Esta distribución es claramente distinta y nunca es polarizada tal y como se observa en el mutante *chs4Δ* (**Figura 22B**). Aunque en ambos casos el transporte de Chs3p está alterado, en el *chs4Δ* el bloqueo debe ocurrir en un estadio posterior, ya que se encuentra polarizada hacia la yema. En ausencia de Chs4p, el patrón de Chs3p-3xHA es difuso pero punteado, lo que indica que Chs3p no se inserta en la MP y queda retenida en vesículas polarizadas. Aunque tratamos de separar este tipo vesículas mediante gradiente en sacarosa, no

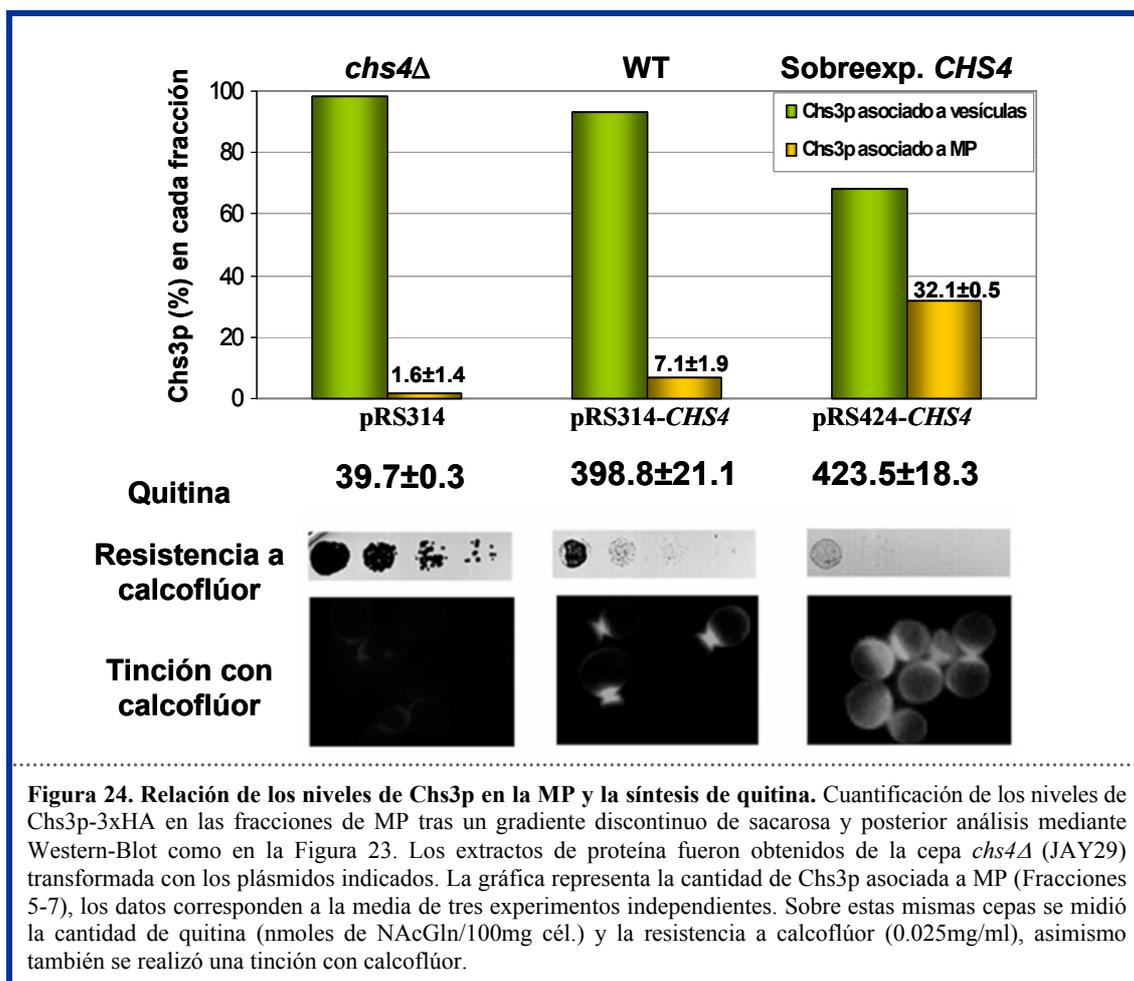
hemos sido capaces de detectar diferencias en cuanto a su densidad en relación con las vesículas de Chs3p típicas de una cepa silvestre.

A priori, este resultado sugería que Chs4p es necesaria para la correcta asociación de Chs3p a la MP. Para comprobarlo, analizamos la distribución de Chs3p en un fraccionamiento subcelular discontinuo de sacarosa, ya que, a diferencia de los continuos, sí que permite detectar la acumulación de Chs3p en la MP. Se utilizaron las cepas *chs3Δ* y *chs3Δ chs4Δ* transformadas con un plásmido con *CHS3-3xHA*. De acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores (Valdivia & Schekman, 2003), Chs3p-3xHA se localiza en dos picos en un gradiente de densidad (**Figura 23**). Una cantidad significativa de la proteína ($25.5 \pm 0.6\%$) coincide con el marcador de MP, Pma1p, que abarca de las fracciones la 5 a la 7. El resto de la proteína se encuentra en fracciones vesiculares (1-4), coincidentes con Pep12p. Sin embargo, en el mutante *chs4Δ*, sólo una pequeña cantidad de Chs3p-3xHA ($6.9 \pm 2.1\%$) colocaliza con Pma1p, mientras que la mayoría se encuentra en fracciones vesiculares. Se obtuvieron los mismos resultados en una cepa con la construcción Chs3p-3xHA integrada en el genoma (Santos & Snyder, 1997), confirmando así, que Chs4p promueve la asociación de Chs3p con la MP.



1.2.2 Chs4p induce la activación de la QSIII mediante la translocación de Chs3p en la MP

Ya se había descrito que la sobreexpresión de *CHS4* provoca un incremento en la actividad QSIII (Trilla et al., 1997), sin embargo se desconocía como se llevaba a cabo dicha activación. Como ya hemos visto, la cantidad de Chs3p asociada a membrana depende de Chs4p, así que tratamos de correlacionar este dato con la síntesis de quitina. Las cepas utilizadas tenían distintos niveles de expresión *CHS4*. Se usó el mutante *chs4Δ* transformado con un plásmido vacío (pRS314), con *CHS4* en monocopia (pRS314-*CHS4*) o con *CHS4* en un plásmido multicopia (pRS424-*CHS4*). Como se puede ver en la **Figura 24**, un incremento en los niveles de Chs4p se corresponde con un aumento de la cantidad de Chs3p asociada a MP (datos obtenidos de un mínimo de 3 gradientes independientes). Mientras que, en el mutante *chs4Δ* la cantidad de Chs3p en fracciones de MP es prácticamente despreciable. En la cepa que sobreexpresa *CHS4* se puede encontrar más de un 30% de Chs3p-3xHA en la MP. Estos resultados coinciden con la síntesis de quitina *in vivo*, ya que a mayores niveles de Chs3p-3xHA en la MP, la cepa tiene más cantidad de quitina, y por tanto más sensibilidad al calcoflúor. Curiosamente, la tinción con calcoflúor en la cepa que sobreexpresa *CHS4*, no sólo



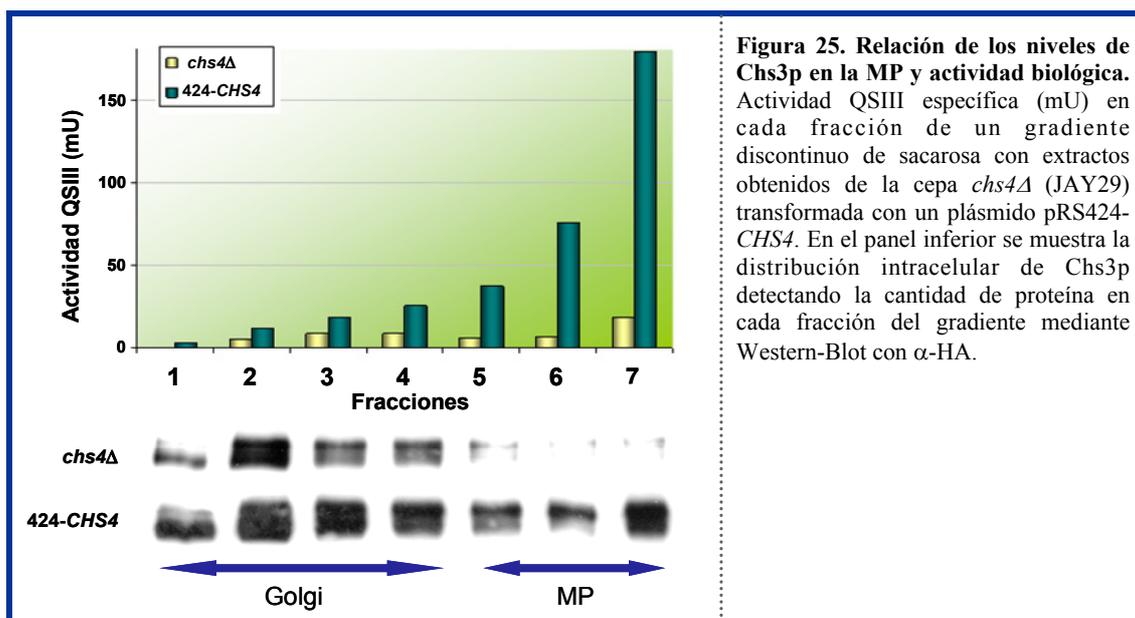


Figura 25. Relación de los niveles de Chs3p en la MP y actividad biológica. Actividad QSIII específica (mU) en cada fracción de un gradiente discontinuo de sacarosa con extractos obtenidos de la cepa *chs4Δ* (JAY29) transformada con un plásmido pRS424-*CHS4*. En el panel inferior se muestra la distribución intracelular de Chs3p detectando la cantidad de proteína en cada fracción del gradiente mediante Western-Blot con α -HA.

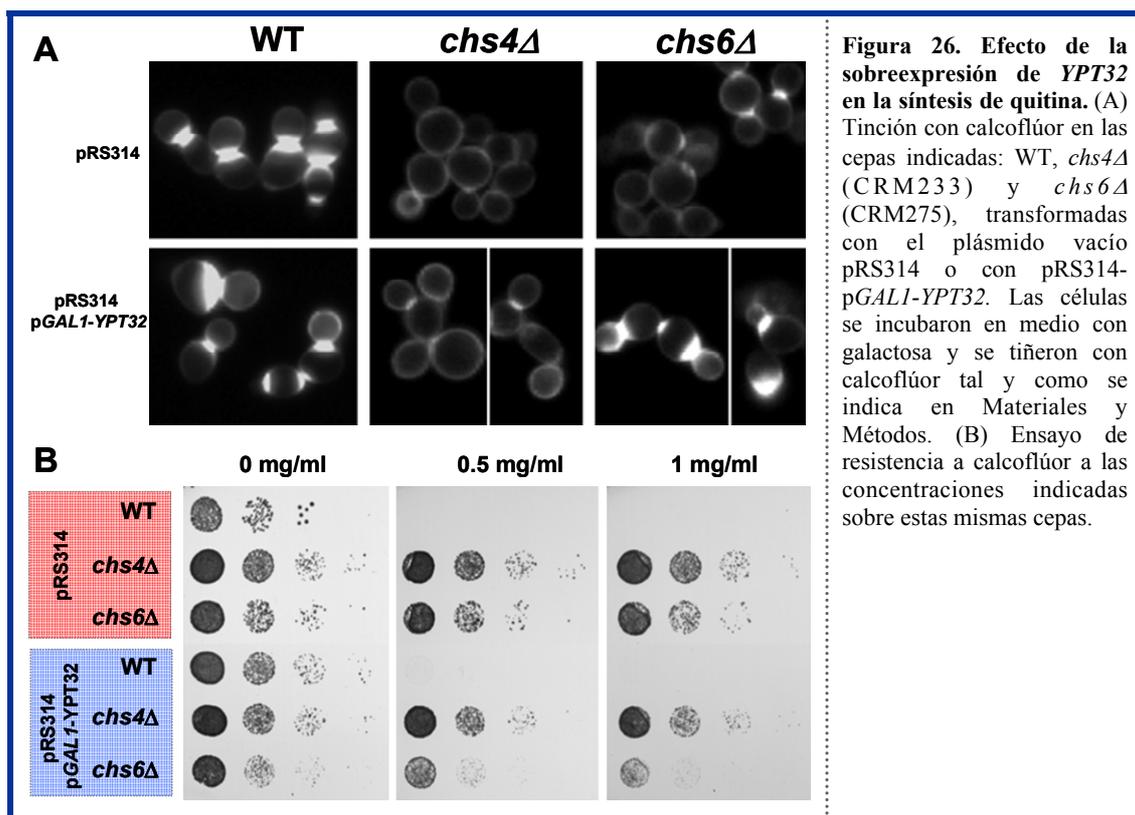
muestra un aumento en la cantidad de quitina, sino que además esta quitina se encuentra ligeramente deslocalizada alrededor del cuello.

Para determinar que realmente existía una correlación entre la distribución de Chs3p y la actividad QSIII, medimos dicha actividad en las diferentes fracciones de un gradiente discontinuo. Para este ensayo utilizamos cepas *chs4Δ* y con sobreexpresión de *CHS4*, porque son los dos modelos más representativos. En cada fracción del gradiente detectamos la cantidad de Chs3p y la actividad QSIII. En ausencia de *CHS4*, Chs3p está prácticamente ausente de la MP y la actividad QSIII es muy baja en todas las fracciones (**Figura 25**). Sin embargo, cuando se sobreexpresa *CHS4* la cantidad de Chs3p aumenta en las fracciones de MP, que se corresponden con un aumento de la actividad QSIII en dichas fracciones. Las fracciones de vesículas (1-4) apenas presentan actividad QSIII a pesar de los altos niveles de Chs3p-3xHA. Por tanto, la Chs3p que se encuentra en vesículas es catalíticamente inactiva, sin embargo, en las fracciones de membrana hay una relación directa entre la cantidad de Chs3p y la actividad QSIII. También cabe destacar, que las fracciones vesiculares no presentan ninguna actividad QSIII, independientemente de la adición de tripsina.

Con todos estos datos se puede concluir que Chs4p tiene un importante papel en el tráfico intracelular de la QSIII, y más específicamente en la translocación de la Chs3p en la MP, relacionando directamente los niveles de Chs3p en la MP y la síntesis de quitina.

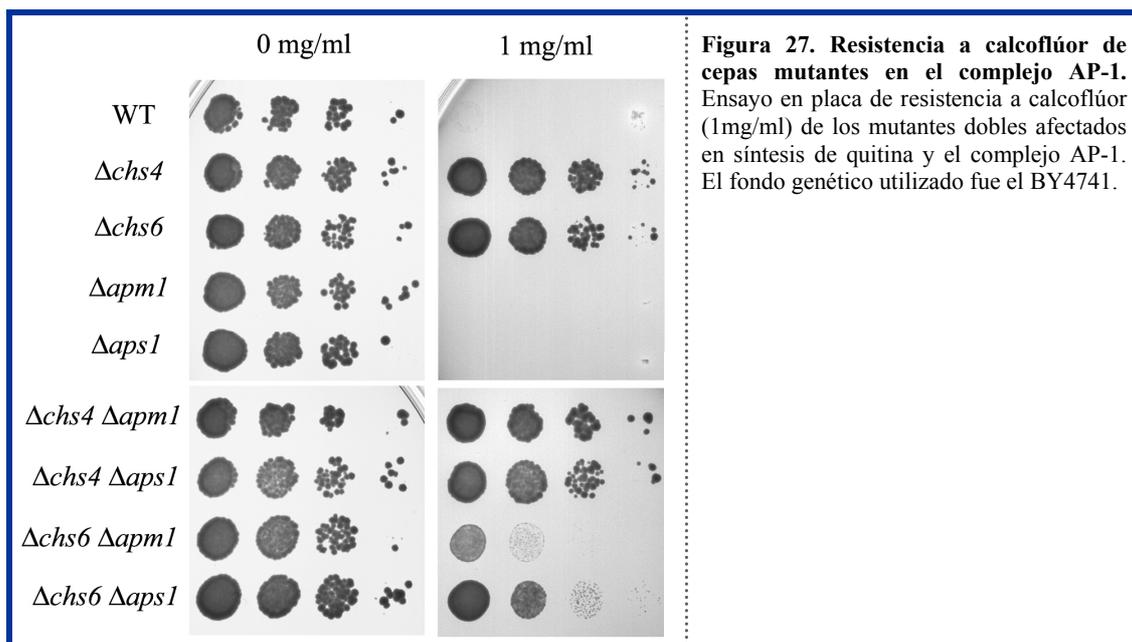
1.2.3 Posible participación de Chs4p en el transporte anterógrado de Chs3p

El tráfico intracelular de Chs3p en el TGN depende dos proteínas, Chs5p y Chs6p (ver introducción), y en ausencia de alguna de ellas Chs3p queda retenida en el Golgi. Sin embargo,



estas proteínas no son un requisito indispensable para el transporte de Chs3p, ya que en determinadas circunstancias se puede restaurar la llegada de Chs3p a la MP. Al sobreexpresar *YPT32*, un homólogo de las proteínas Rab de mamíferos implicado en el tráfico de salida del Golgi y el reciclaje desde endosomas al Golgi, se puede eludir el bloqueo de Chs3p en las cepas *chs5Δ* y *chs6Δ* (Ortiz & Novick, 2006). Con el fin de determinar si Chs4p participaba en el transporte intracelular de Chs3p, y si era o no prescindible para la actividad QSIII, se sobreexpresó *YPT32* bajo el control del promotor *GALI*. La sobreexpresión de *YPT32* restaura la síntesis de quitina y la sensibilidad al calcoflúor en la cepa *chs6Δ*, pero no en el mutante *chs4Δ* (Figura 26). De la misma forma, cuando analizamos la localización de Chs3p-GFP en estas condiciones, se puede ver que la sobreexpresión de *YPT32* en el mutante *chs4Δ* no produce un incremento de la acumulación de Chs3p en el septo, ya que sólo se detecta señal en el 1% de las células (n=294) (Datos no mostrados).

También se había descrito que en los mutantes afectados en el complejo AP-1, Chs3p no se retiene adecuadamente en los compartimentos endocíticos y escapa hacia la MP. Esto ocurre tanto en un silvestre como en el mutante *chs6Δ* (Valdivia et al., 2002). Así que combinamos mutantes de las subunidades del complejo AP-1 (*aps1Δ* o *apm1Δ*) con el mutante *chs4Δ*, y los analizamos mediante un ensayo de resistencia a calcoflúor en placa. Mientras que los mutantes dobles *aps1Δ chs6Δ* y *apm1Δ chs6Δ*, recuperaban cierta sensibilidad al calcoflúor, los dobles *aps1Δ chs4Δ* y *apm1Δ chs4Δ* seguían manteniendo un patrón de



resistencia similar al mutante simple *chs4Δ* (**Figura 27**). Lo que indica que en ausencia de Chs4p no se puede conseguir una actividad QSIII funcional aunque se vea afectada la integridad del complejo AP-1.

Todos estos resultados demuestran que Chs4p es un requisito indispensable para la activación de la QSIII y que no puede ser eludido por la alteración de otros componentes del transporte. Estos datos claramente posicionan a Chs4p en una parte muy tardía del transporte intracelular de Chs3p, más allá del TGN.

En el mutante *chs4Δ*, Chs3p queda retenida en unas vesículas polarizadas aparentemente distintas de las vesículas de los mutantes *chs5Δ* y *chs6Δ* (**Figura 22B**). Aunque tratamos de caracterizar ambos tipos de vesículas mediante gradientes continuos en sacarosa, no hemos sido capaces de separarlas adecuadamente, ya que presentan una densidad muy similar.

1.3 Chs4p está involucrada en la estabilidad de Chs3p en la MP

Nuestros resultados indican que Chs4p es una proteína implicada en la correcta localización de Chs3p en la MP y que su función específica parece estar relacionada con los estadios finales del transporte de Chs3p.

Aunque los datos presentados son totalmente compatibles con un bloqueo en el proceso en el transporte anterógrado, no excluyen un hipotético papel de Chs4p en la endocitosis de Chs3p (Holthuis et al., 1998), un proceso muy poco estudiado en relación con la

QSIII. Por ello, analizamos la localización Chs3p y la síntesis de quitina tras bloquear el proceso de endocitosis.

1.3.1 Bloqueo de endocitosis: mutante *end4Δ*

Para bloquear la endocitosis utilizamos el mutante nulo *end4Δ*. La proteína End4p participa en la interacción entre la clatrina que recubre las vesículas endocíticas y la actina, y su delección reduce drásticamente la internalización de proteínas y colorantes desde la MP (Raths et al., 1993; Wesp et al., 1997). El mutante *end4Δ* es termosensible a 37°C, muestra un fenotipo de crecimiento lento y células de gran tamaño. La delección de *CHS4* en este mutante agrava todos estos fenotipos y provoca mucha lisis celular. En la cepa silvestre, Chs3p-GFP se localiza en la zona del septo y en vesículas intracelulares, sin embargo, en el mutante *end4Δ*, Chs3p-GFP queda retenida en la MP y disminuye su localización en la zona del cuello (**Figura 28B**). Asimismo, también desaparece los puntos intracelulares. En los mutantes *end4Δ* se expresó Chs3p-GFP desde un plásmido dejando la copia silvestre de la proteína, ya que el doble *end4Δ chs3Δ* presenta graves defectos de crecimiento y fenotípicos.

Cuando analizamos la localización de Chs3p mediante microscopía confocal, pudimos confirmar que en el mutante *end4Δ*, Chs3p-GFP presentaba una distribución uniforme por la MP, descartando así una posible acumulación de Chs3p-GFP en el RE. La cuantificación de la relación entre la intensidad de la señal en el septo y la MP reveló que en un silvestre la intensidad relativa (Intensidad en MP/ Intensidad en el septo) era de 0.19 ± 0.05 , pero en el

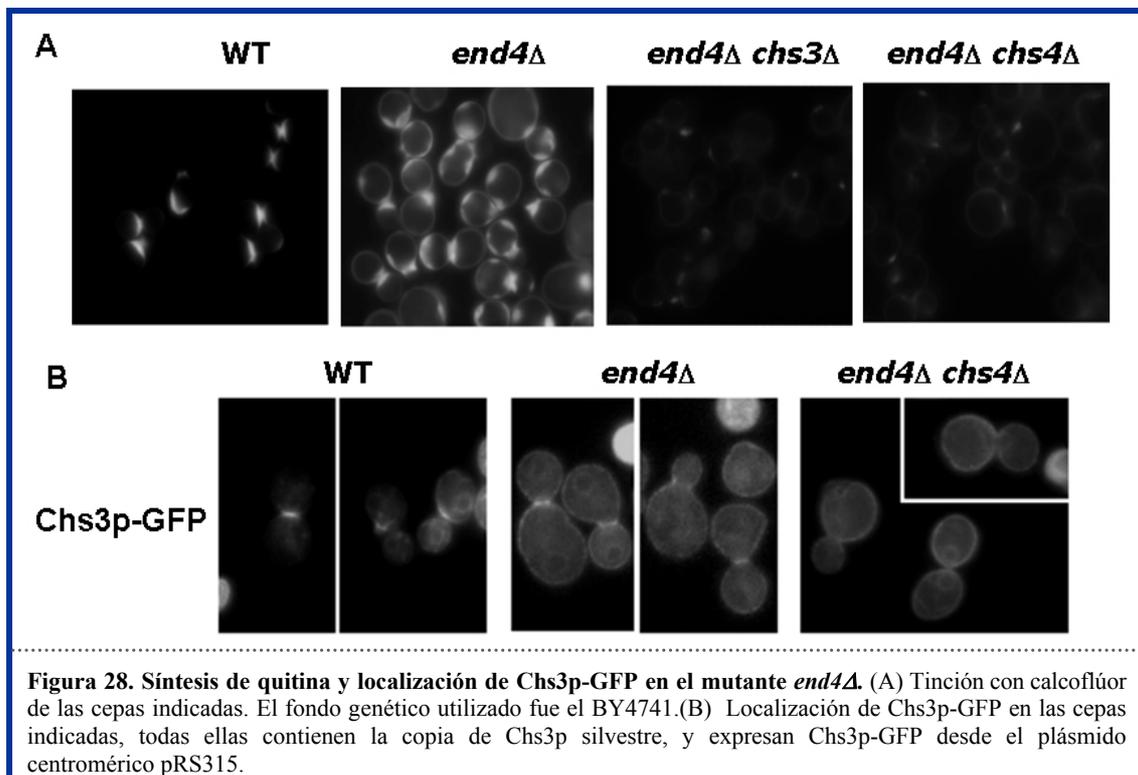
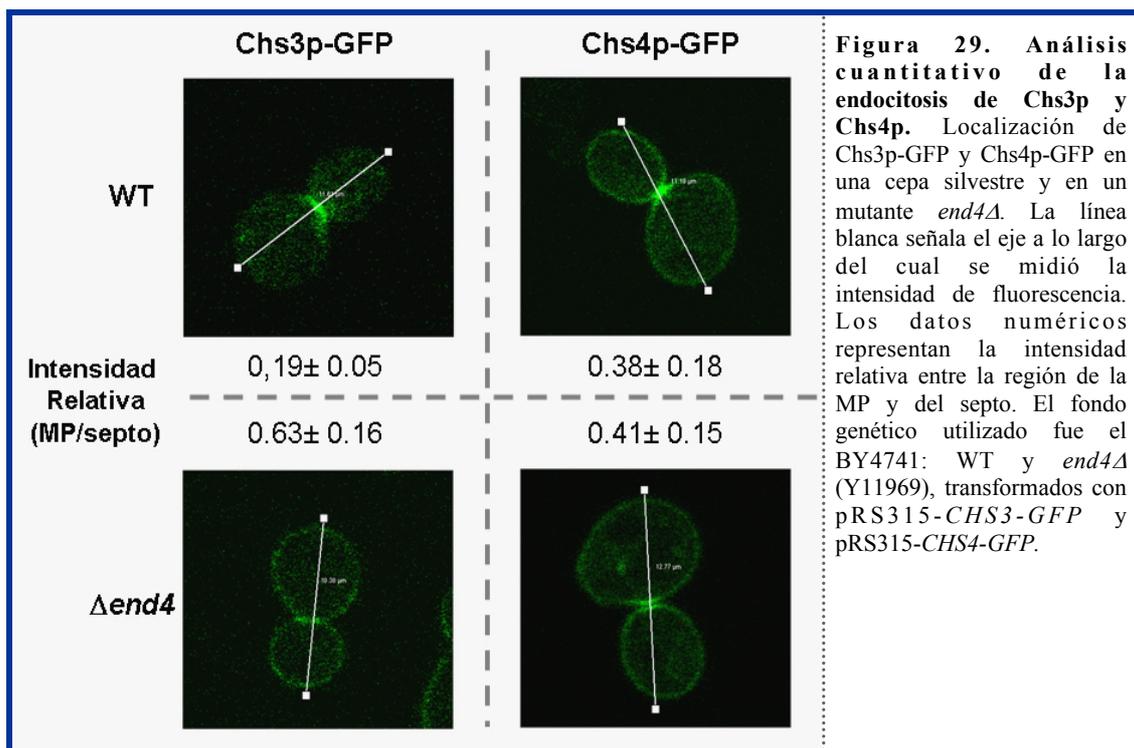


Figura 28. Síntesis de quitina y localización de Chs3p-GFP en el mutante *end4Δ*. (A) Tinción con calcoflúor de las cepas indicadas. El fondo genético utilizado fue el BY4741. (B) Localización de Chs3p-GFP en las cepas indicadas, todas ellas contienen la copia de Chs3p silvestre, y expresan Chs3p-GFP desde el plásmido centromérico pRS315.



mutante *end4Δ* esta relación aumentaba hasta tres veces más ($0,63 \pm 0,14$) (**Figura 29**). Esto dato indica que Chs3p no se endocita, acumulándose a lo largo de la MP. Del mismo modo, analizamos si Chs4p-GFP también se regula por endocitosis. En este caso, Chs4p-GFP presenta la misma localización en el cuello y en el resto de la MP, tanto en un silvestre como en un *end4Δ*. La cuantificación mediante microscopía confocal mostró que la intensidad relativa en el silvestre y en el *end4Δ* es muy similar: $0,38 \pm 0,16$ y $0,41 \pm 0,13$, respectivamente. En base a estos resultados, podemos afirmar que Chs3p depende de endocitosis para su correcta localización en el septo, mientras que Chs4p parece no estar regulada por la ruta endocítica.

Al teñir el mutante *end4Δ* con calcoflúor, se observa una deslocalización de quitina en forma de parches por toda la pared celular (**Figura 28A**). El mutante *tlg1Δ* (Holthuis et al., 1998), afectado en el reciclaje endocítico, también presenta estos mismos fenotipos de retención de Chs3p en la MP y quitina dispersa por la pared. Por lo que podemos relacionar el bloqueo de endocitosis de Chs3p con una redistribución de la síntesis de quitina.

En el mutante doble *end4Δ chs4Δ*, Chs3p-GFP también queda retenida en la MP, indicando que Chs3p alcanza la MP incluso en ausencia de Chs4p. Sin embargo, se mantiene en un estado inactivo, ya que no se produce la síntesis de quitina (**Figura 28A**). Por tanto, se puede concluir que Chs4p participa en la estabilización de Chs3p en la MP siendo un requisito necesario, pero no suficiente, para la activación de la QSIII.

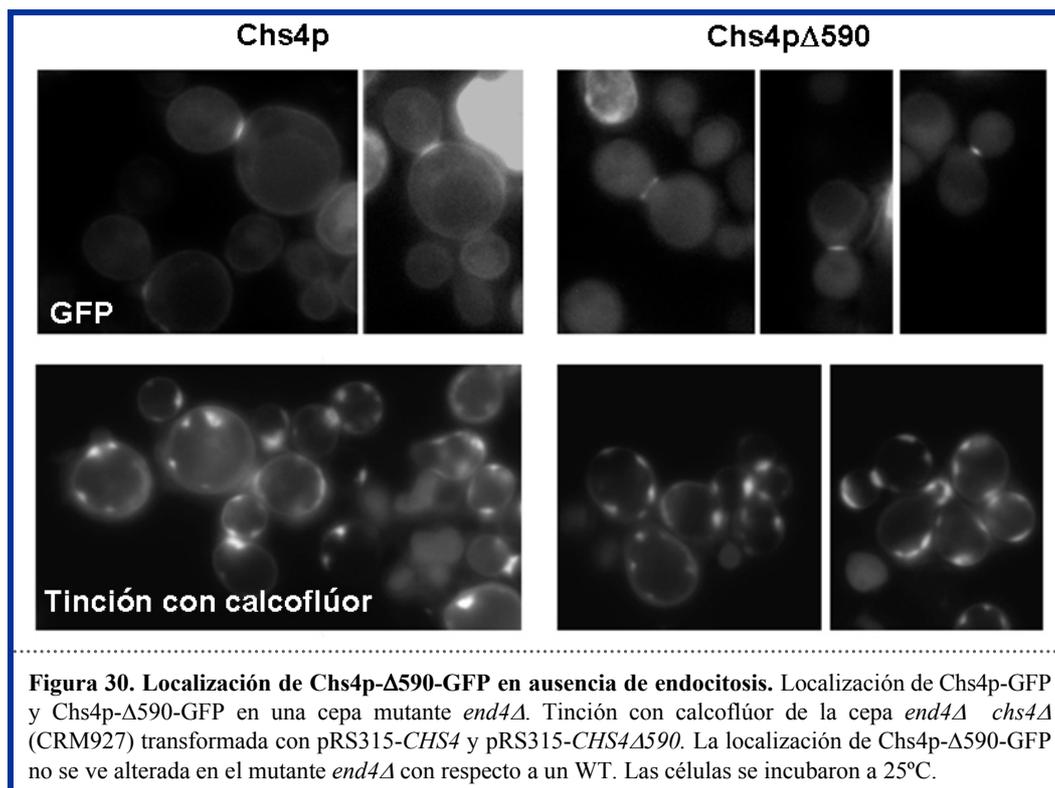


Figura 30. Localización de Chs4p-Δ590-GFP en ausencia de endocitosis. Localización de Chs4p-GFP y Chs4p-Δ590-GFP en una cepa mutante *end4Δ*. Tinción con calcoflúor de la cepa *end4Δ chs4Δ* (CRM927) transformada con pRS315-*CHS4* y pRS315-*CHS4Δ590*. La localización de Chs4p-Δ590-GFP no se ve alterada en el mutante *end4Δ* con respecto a un WT. Las células se incubaron a 25°C.

Como ya se ha mencionado anteriormente, tanto Chs4p-GFP como Chs3p-GFP se localizan a lo largo de la MP en un mutante *end4Δ*. Para ver si era necesaria la presencia de Chs4p para activar la QSIII en las paredes laterales, utilizamos la truncación Chs4p-Δ590. Se transformó el mutante doble *end4Δ chs4Δ* con un plásmido que contenía la construcción Chs4p-GFP o Chs4p-Δ590-GFP. En el mutante *end4Δ*, la truncación Chs4p-Δ590-GFP, presenta la misma localización que en una cepa silvestre, sólo se ve en la zona del septo y no se detecta a lo largo de la MP (**Figura 30**). Sin embargo al teñir con calcoflúor, se observan los parches de quitina típicos del mutante simple *end4Δ*. Por tanto, es evidente que la presencia de Chs4p por toda la membrana no es esencial para la síntesis de quitina lateral y, aparentemente, Chs3p, tras su inserción en el cuello, permanece activa incluso en ausencia de Chs4p. Se obtuvo el mismo resultado utilizando Latrunculina A para bloquear la endocitosis (ver más adelante).

1.3.2 Bloqueo de endocitosis: Latrunculina A

Ya que el mutante *end4Δ chs4Δ* presenta graves defectos tanto en morfología como en crecimiento, es posible que los fenotipos observados se debieran a un efecto pleiotrópico. Por tanto, decidimos usar la Latrunculina A, que es una droga que despolimeriza la actina provocando un efecto inmediato en el bloqueo de la endocitosis. La cepa silvestre y el mutante *chs4Δ* conteniendo ambos el plásmido Ypelac111-*CHS3*-GFP, fueron tratados con concentraciones crecientes de Latrunculina A (15μM-100μM). Tras 15 minutos de incubación

con la droga, Chs3p se localizaba a lo largo de toda MP con cierta acumulación a nivel del cuello, siendo esta distribución idéntica en el mutante *chs4Δ* y en el silvestre (**Figura 31A**). El mismo tratamiento sobre el mutante *chs6Δ*, no altera de la localización de Chs3p-GFP, que

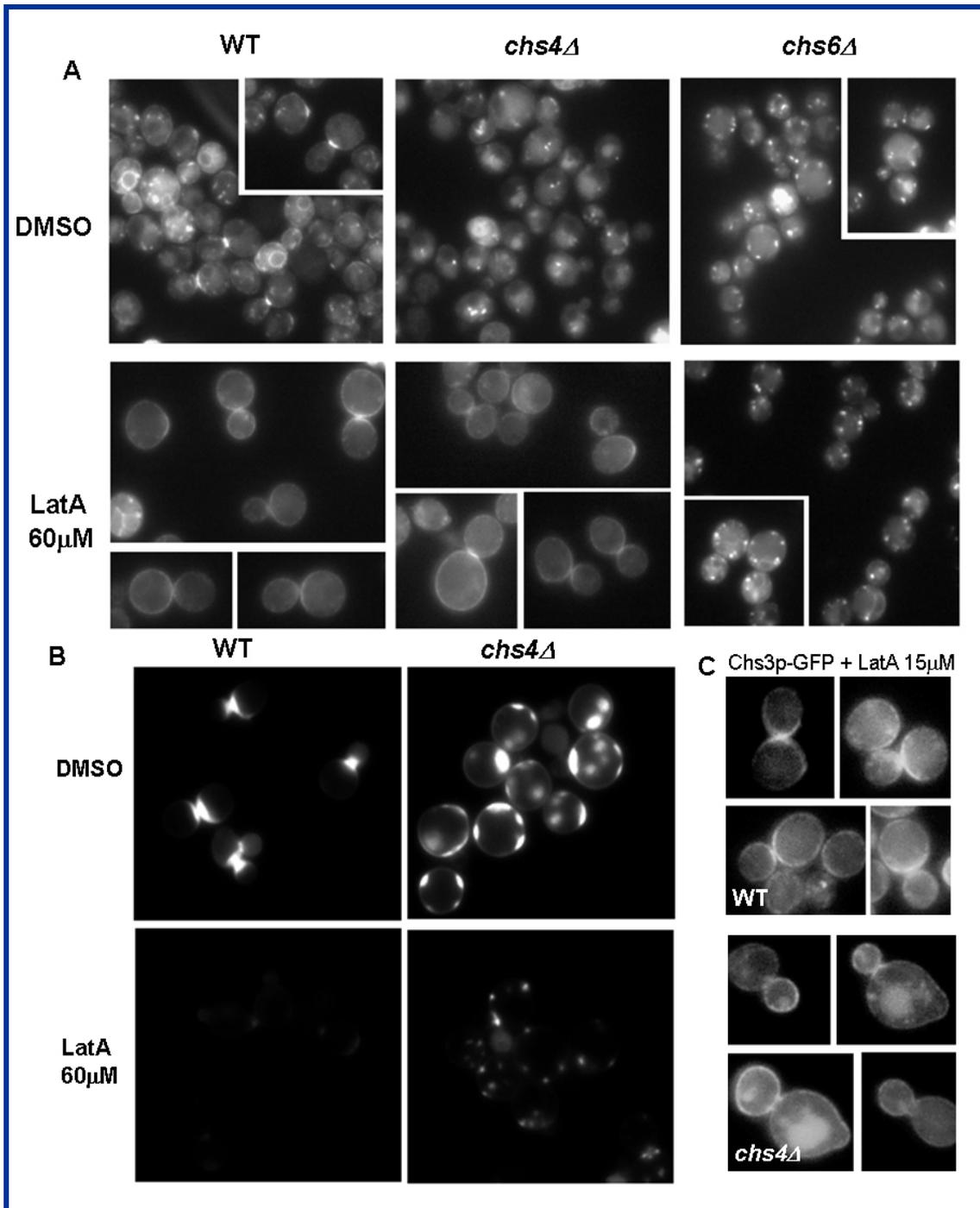


Figura 31. Síntesis de quitina y localización de Chs3p-GFP tras el tratamiento con Latrunculina A. (A) Localización de Chs3p-GFP en las cepas indicadas tras un tratamiento con 60μM de LatrunculinaA durante una hora. (B) Tinción con calcoflúor de una cepa silvestre y un mutante *chs4Δ* tras un tratamiento de una hora con 60 μM de Lat.A. (C) Localización de Chs3p-GFP tras un tratamiento con 15μM de LatA durante 15 minutos. Obsérvese que la intensidad de fluorescencia no es uniforme a lo largo de toda la MP. Las cepas utilizadas son derivadas del W303, *chs3Δ* (CRM103), *chs3Δchs4Δ* (CRM892) y *chs3Δchs6Δ* (CRM1077), transformadas con el plásmido Ycplac111-CHS3-GFP.

permanece retenida en el TGN.

De la misma forma que sucedía en los mutantes *end4Δ*, el tratamiento con Latrunculina A deslocaliza Chs3p por toda la MP y produce una redistribución de quitina, en forma de parches, por las paredes laterales. Y al igual que ocurría en el *end4Δ chs4Δ*, esta síntesis depende de Chs4p (**Figura 31B**), ya que no se produce en el mutante *chs4Δ*.

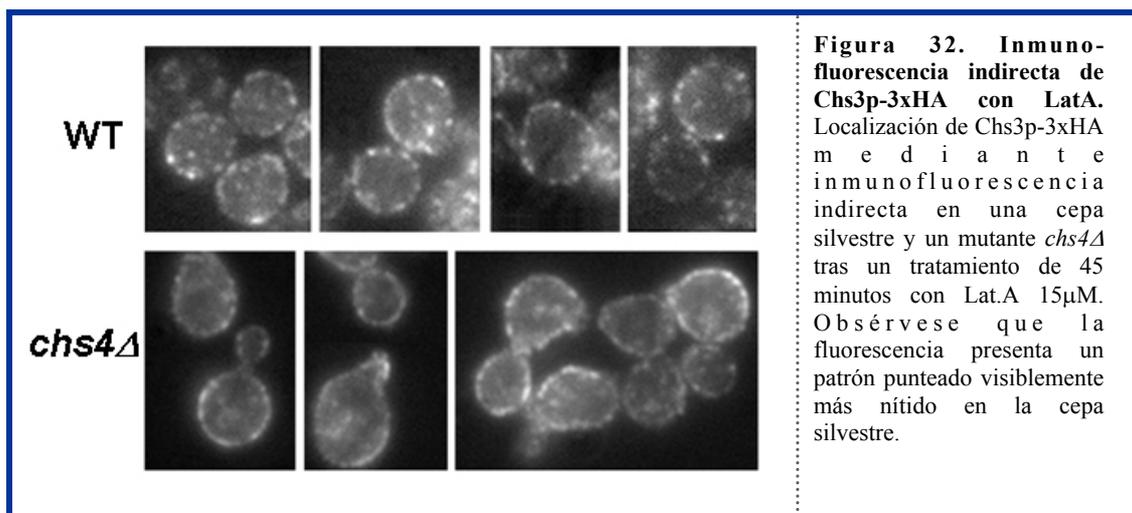
Experimentos con bajas concentraciones de Latrunculina A (15μM) y tiempos cortos aportaron información adicional. En la cepa silvestre, a los 15 minutos de incubación con la droga, se puede ver claramente un gradiente de distribución de Chs3p-GFP, que comienza en el cuello y se va extendiendo por las paredes laterales (**Figura 31C**). Además, prácticamente ninguna célula presentaba tinción en la yema hija (<2.5% n=64). Sin embargo, el aspecto del mutante *chs4Δ* era algo diferente, ya que se detectaba Chs3p-GFP en la MP de bastantes yemas (21.7± 5.9 n=94). Esto indica que en ausencia de Chs4p la difusión comienza desde la célula hija. Este resultado no es sorprendente si tenemos en cuenta que en el mutante *chs4Δ*, Chs3p no se puede anclar al anillo de septinas y su transporte polarizado la llevaría hasta la yema. A tiempos largos de incubación Chs3p-GFP presenta la misma distribución uniforme tanto en el silvestre como en el mutante *chs4Δ*.

Para descartar que la deslocalización de alguna de las proteínas de la maquinaria del septo, fuera la responsable de la deslocalización de Chs3p-GFP, determinamos la localización de Bni4p-YFP y la septina Cdc3-GFP. Tras el tratamiento con Latrunculina A (15μM), ambas proteínas se mantienen correctamente localizadas en la zona del septo, incluso a tiempos largos de incubación (70 min.) (Datos no mostrados).

Todos estos datos demuestran que Chs3p se inserta en la MP en ausencia de Chs4p, pero es rápidamente endocitada. Al bloquear el proceso de endocitosis, Chs3p ya sea activa o inactiva, se redistribuye por la MP desde la zona de inserción en el cuello. El intercambio continuo de Chs3p, mediante un equilibrio dinámico entre el transporte anterógrado y la endocitosis, es el responsable de su correcta localización en el septo.

1.3.3 Asociación de Chs3p a “Lipid Rafts”

Cuando se analizan detenidamente las imágenes de Chs3p-GFP retenida en MP, tras un tratamiento con Latrunculina A o en el mutante *end4Δ*, se observa un patrón que podría pasar desapercibido a primera vista; Chs3p parece estar agregada en pequeños puntos en la MP. Este fenotipo es más evidente cuando se realiza una inmunofluorescencia de Chs3p-3xHA tras el tratamiento con Latrunculina A (**Figura 32**), ya que al fijar las células con formaldehído se evita la difusión constante de Chs3p-GFP en las células *in vivo*.



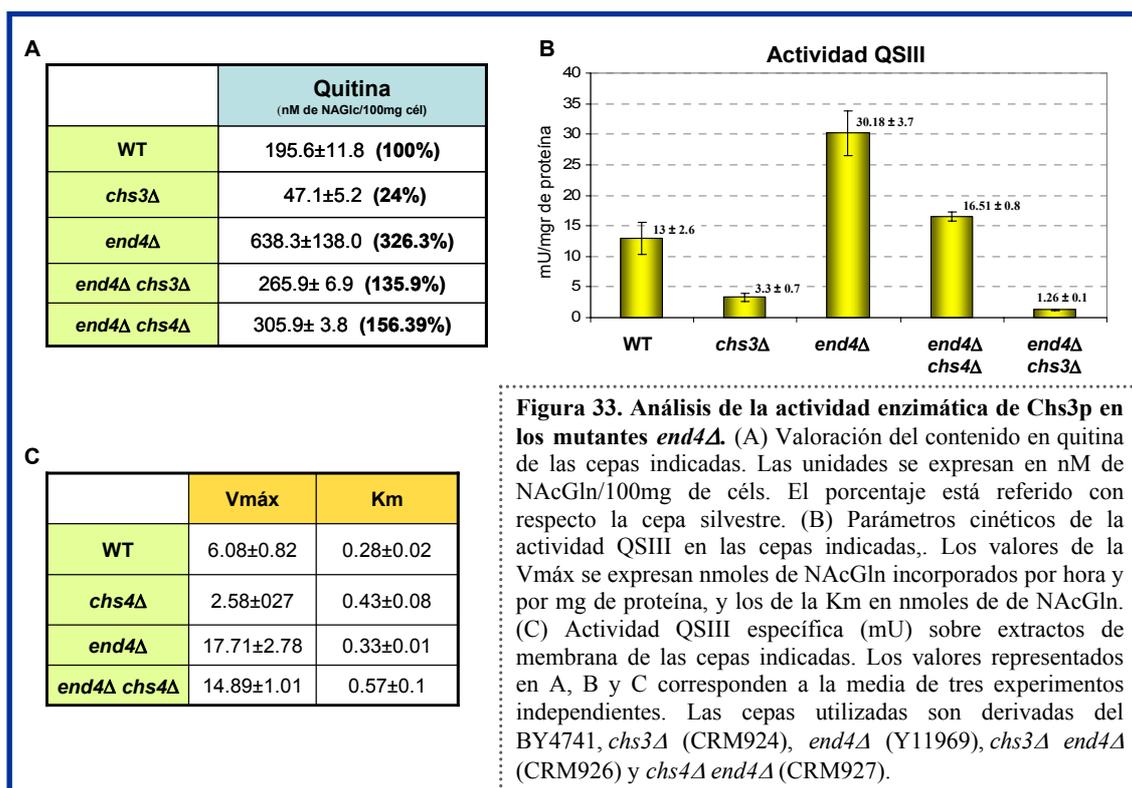
Generalmente, cuando una proteína de membrana presenta un patrón punteado, es que se encuentra asociada a microdominios de membrana denominados Lipid Rafts. Estos dominios de membrana se caracterizan por ser resistentes a detergentes y presentar una ordenación lipídica más estable. Las proteínas asociadas a estos dominios participan en muchas funciones como son la señalización celular, tráfico de moléculas, polaridad, etc...En algunos casos la asociación de una proteína a estos dominios puede determinar su función (Alvarez et al., 2007).

Para ver si Chs3p está asociada a ellos, se trataron las muestras de un silvestre y de un mutante *end4Δ* con Tritón x-100 en frío y se centrifugaron en un gradiente de Optiprep. En ningún caso se detectó asociación de Chs3p-3xHA a Lipid Rafts (Ver más adelante, **Figura 41**). Por tanto, Chs3p no se encuentra en estos microdominios, ni siquiera cuando queda totalmente retenida en la MP, como sucede en el mutante *end4Δ*.

1.3.4 Caracterización de los mutantes *end4Δ*

Para seguir caracterizando la actividad QSIII en condiciones de bloqueo de endocitosis, decidimos utilizar los mutantes *end4Δ*. A pesar de que estos mutantes mostraban defectos fenotípicos, algunos de los experimentos planteados requerían una gran cantidad de células y serían inabordables mediante el uso de Latrunculina A debido a su coste económico.

En primer lugar, valoramos la cantidad de quitina en las diferentes cepas *end4Δ*. Como se puede ver en la **Figura 33A**, el mutante *end4Δ* contiene hasta tres veces más cantidad de quitina que un silvestre. Curiosamente, los mutantes dobles *end4Δ chs3Δ* y *end4Δ chs4Δ*, presentan también más quitina que la cepa silvestre, pero sin llegar a los niveles del *end4Δ*. Ya que es evidente que el doble *end4Δ chs3Δ* no presenta actividad QSIII, es comprensible atribuir este aumento de quitina a la actividad QSII, ya que su inactivación ocurre mediante endocitosis (Chuang & Schekman, 1996).



Este resultado, a primera vista, parece contradictorio con la imágenes obtenidas de la tinción con calcoflúor donde las cepas *end4Δ chs3Δ* y *end4Δ chs4Δ* presentan menos fluorescencia que una cepa silvestre (**Figura 28**). Sin embargo, desconocemos la afinidad del calcoflúor por la quitina sintetizada cada actividad QS así como su modo de acción. De acuerdo con la cantidad de quitina, en un ensayo de resistencia a calcoflúor se observó que el mutante simple *end4Δ* era más sensible que la cepa silvestre. Sin embargo, los dobles mutantes *end4Δ chs3Δ* y *end4Δ chs4Δ*, con más contenido en quitina que un silvestre, son más resistente que éste (Datos no mostrados). Lo que indica que el calcoflúor afecta más a las cepas con quitina sintetizada por la actividad QSIII, sugiriendo una menor interacción del calcoflúor con la quitina formada por la QSII. Esto explica la pobre tinción de los mutantes dobles.

Para continuar con la caracterización de estos mutantes determinamos la actividad QSIII *in vitro* de las cepas *end4Δ*. La actividad se midió sin tripsina y añadiendo níquel y cobalto a la reacción para inhibir las actividades QSI y QSII. De acuerdo con la cantidad de quitina, el mutante *end4Δ* presentaba una actividad QSIII tres veces superior a la de una cepa silvestre (**Figura 33C**). Sorprendentemente, la cepa *end4Δ chs4Δ* presentaba un incremento significativo de la QSIII *in vitro*. Esta activación se debía exclusivamente a la actividad QSIII, ya que el control *end4Δ chs3Δ* no mostraba actividad QSIII. Por tanto la actividad QSIII en el mutante *end4Δ chs4Δ* parece inactiva *in vivo*, ya que no sintetiza quitina, pero sí que presenta una cierta actividad *in vitro*.

Para profundizar, a nivel enzimático, en las características de la actividad QSIII en estos mutantes, determinamos los parámetros cinéticos (K_m y $V_{m\acute{a}x}$). En el mutante *chs4Δ* se detectan valores inferiores de la $V_{m\acute{a}x}$ con respecto a un silvestre, lo que indica una disminución en la velocidad de procesamiento del sustrato (**Figura 33B**). Esto se había asociado con el defecto en actividad QSIII en el mutante *chs4Δ* (Trilla et al., 1997), pero ahora hay que tener en cuenta que en este mutante Chs3p no se localiza en la MP sino en vesículas intracelulares. En los mutantes *end4Δ* y *end4Δ chs4Δ* se incrementa la $V_{m\acute{a}x}$, lo que significaría un procesamiento rápido del sustrato, siempre que vaya acompañado de una K_m (afinidad por el sustrato) adecuada. Esto sí ocurre en el *end4Δ*, que presenta una K_m muy parecida a la del silvestre. Sin embargo, el valor de la K_m en *end4Δ chs4Δ* es prácticamente el doble, lo que indica en una menor afinidad por el sustrato. Esto sugiere que el centro catalítico de la enzima en este mutante está alterado, lo que explicaría la falta de funcionalidad de Chs3p aunque quede retenida en la MP. Por lo tanto, todo apunta a que Chs4p de alguna forma modifica el centro catalítico de la enzima haciéndola funcional.

En base a estos resultados podemos decir que Chs4p no sólo participa en el correcto reciclaje endocítico de Chs3p, sino que además regula el estado catalítico de la QSIII mediante la modificación su centro catalítico, ya sea de forma directa o indirecta.

2. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII EN CONJUGACIÓN

Hemos demostrado que Chs4p promueve la translocación de Chs3p en la MP a partir de vesículas intracelulares, en una forma estable y enzimáticamente activa. Este proceso está regulado mediante un equilibrio entre el transporte anterógrado de Chs3p y su endocitosis, responsable además de su correcta localización en el cuello. Por tanto, decidimos analizar otra etapa del ciclo de vida de la levadura en la que existiera una reestructuración de toda la maquinaria de secreción. Esto ocurre durante el proceso de conjugación, en el cual se da un cambio morfológico, el paso de célula vegetativa a *shmoo*, debido a una hiperpolarización del transporte intracelular.

Durante el proceso de conjugación la quitina se distribuye en forma de banda difusa en la base de la proyección (**Figura 34**). El contenido en quitina aumenta hasta 3 veces y esto parece estar relacionado con un incremento de los niveles de Chs3p. Sin embargo, se desconoce como se regula la activación de la QSIII, aunque de forma similar a lo que ocurre en vegetativo, se ha demostrado que depende de Chs7p, Chs5p y Chs4p, aunque no de Chs6p.

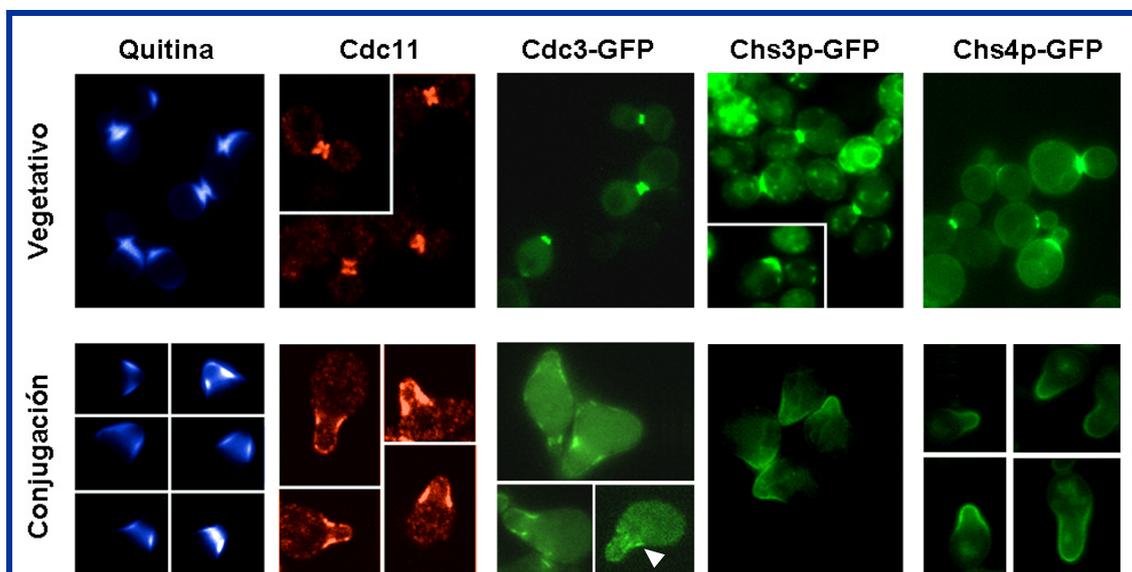


Figura 34. Localización de la quitina y distintas proteínas del septo en vegetativo y en conjugación. Tinción con calcoflúor y localización de Cdc3p-GFP, Chs3p-GFP y Chs4-GFP mediante fluorescencia directa y Cdc11p mediante inmunofluorescencia indirecta, tanto en fase vegetativa (Fila superior) como en conjugación (Fila inferior). La inducción del proceso de conjugación se realizó mediante la adición de 200 ng/ml de factor α un cultivo en fase logarítmica y se incubó durante 3 horas. Las cepas utilizadas son derivadas del 15Daub. En el caso del Chs3p-GFP y Chs4p-GFP las proteínas se expresaron desde un plásmido centromérico en cepas delecionadas del gen de interés, de tal forma que la única copia funcional en la cepa es la marcada con la GFP. En el caso del Cdc3-GFP se mantuvo la copia silvestre del gen. La flecha indica la disposición en barras paralelas característica de las septinas durante la conjugación.

2.1 Localización de quitina y proteínas de la maquinaria del septo

Para determinar la localización de Chs3p y Chs4p, y en general para todos los experimentos de conjugación, se usaron cepas de tipo sexual a delecionadas en el gen *BARI*, la proteasa que degrada el factor α , y se incubaron durante 2.5 horas con factor α . En conjugación, a diferencia de lo que ocurre en vegetativo, la distribución de quitina no coincide completamente con el complejo QSIII (**Figura 34**). Mientras que Chs3p y Chs4p se distribuyen polarizadamente a lo largo de la MP de la proyección, la distribución de la quitina está restringida a la base del *shmoo*, la misma localización que presentan las septinas Cdc11p y Cdc3p (Ford & Pringle, 1991; Kim et al., 1991). Es un dato llamativo si tenemos en cuenta que, en vegetativo, Chs3p y Chs4p colocalizan con la quitina, y a su vez con las septinas. Como las septinas y la quitina colocalizan en conjugación, podría ser que el complejo QSIII se ancle a las septinas, tal como ocurre en vegetativo, y que este anclaje fuera el responsable de su estado funcional. Sin embargo, determinados datos experimentales obtenidos en nuestro laboratorio contradicen esta hipótesis (ver más adelante).

A diferencia de lo que ocurre en vegetativo, Chs3p se mantiene correctamente localizada en la MP de la proyección incluso en ausencia de Chs4p (**Figura 35**). Aun así, sigue

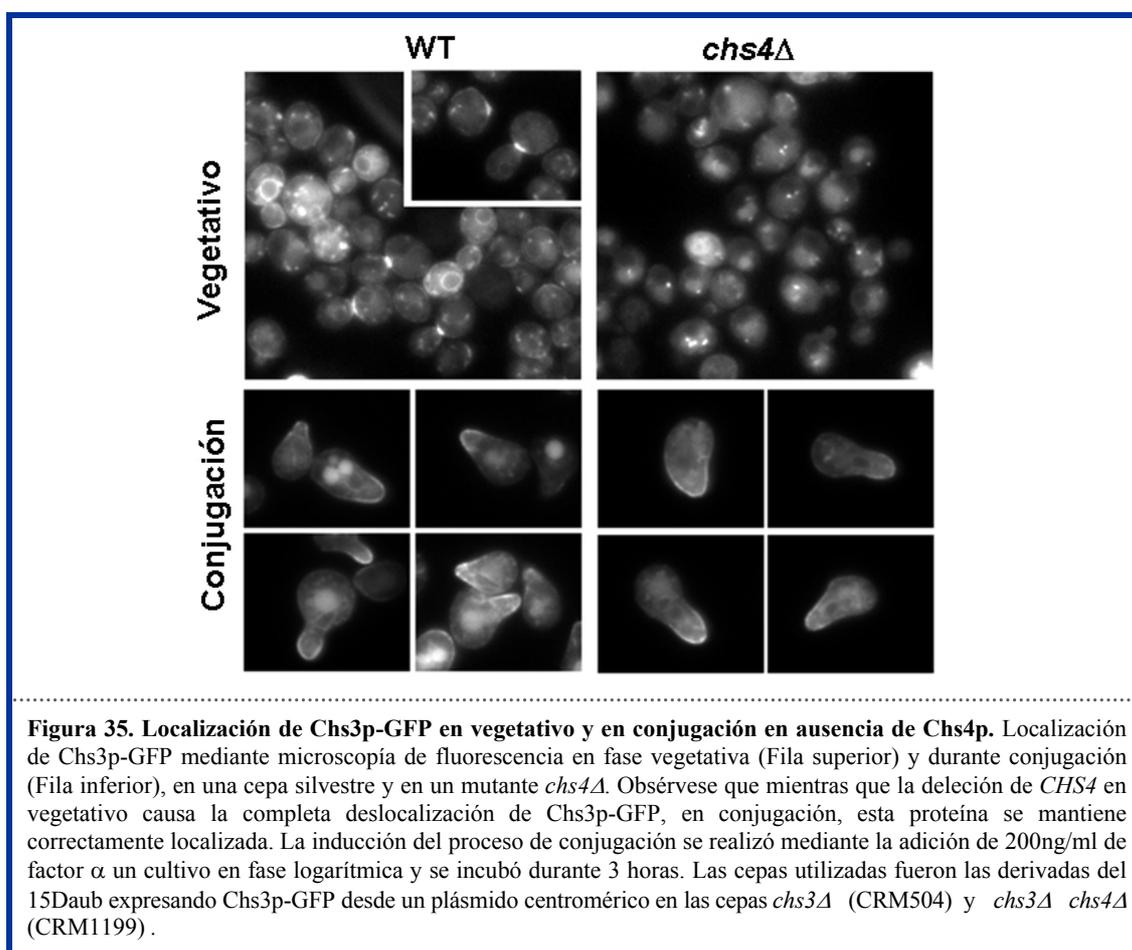


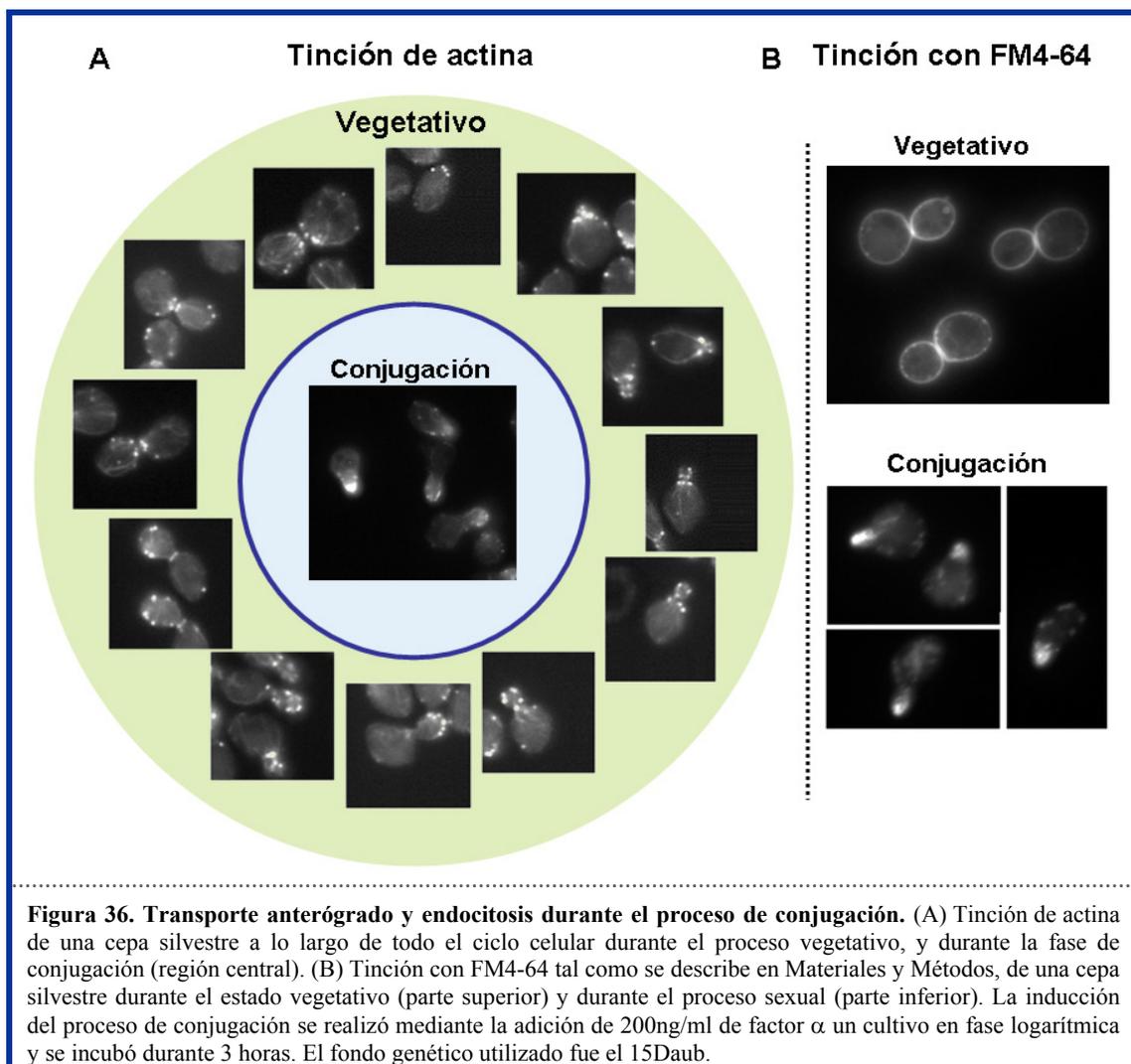
Figura 35. Localización de Chs3p-GFP en vegetativo y en conjugación en ausencia de Chs4p. Localización de Chs3p-GFP mediante microscopía de fluorescencia en fase vegetativa (Fila superior) y durante conjugación (Fila inferior), en una cepa silvestre y en un mutante *chs4Δ*. Obsérvese que mientras que la deleción de *CHS4* en vegetativo causa la completa deslocalización de Chs3p-GFP, en conjugación, esta proteína se mantiene correctamente localizada. La inducción del proceso de conjugación se realizó mediante la adición de 200ng/ml de factor α un cultivo en fase logarítmica y se incubó durante 3 horas. Las cepas utilizadas fueron las derivadas del 15Daub expresando Chs3p-GFP desde un plásmido centromérico en las cepas *chs3Δ* (CRM504) y *chs3Δ chs4Δ* (CRM1199).

dependiendo de Chs4p para ser catalíticamente activa, ya que los *shmoos* del mutante *chs4Δ* no sintetizan quitina. En conjugación, Chs3p se acumularía en la MP tanto en estado activo como inactivo, una situación diferente a la que encontramos en vegetativo y que parece indicar que el reciclado endocítico de Chs3p es diferente. Por tanto, en conjugación, la regulación de la QSIII presenta una serie de características distintas a las de vegetativo.

2.2 Transporte anterógrado y endocitosis

La localización de Chs3p durante el proceso de conjugación sugiere que el *turnover* endocítico de Chs3p está alterado. Esta alteración podría ser la consecuencia de un transporte anterógrado y una endocitosis característicos durante el proceso de conjugación.

En las células, el transporte de proteínas está dirigido hacia las zonas de crecimiento activo y viene determinado por la disposición de los cables de actina. En vegetativo, los cables se dirigen hacia la yema hija en crecimiento o hacia la zona del cuello tras la deposición del septo (Amberg, 1998), y durante el proceso de conjugación los cables se orientan hacia la



punta de la proyección (**Figura 36A**) (Hasek et al., 1987). El proceso de endocitosis, por su parte, se detecta mediante la internalización activa del FM4-64, un compuesto lipofílico fluorescente. Este fluorocromo se detecta, en un primer momento, en la MP y se va transportando por la ruta endocítica hasta acabar finalmente en la vacuola. En vegetativo, la tinción con FM4-64 es uniforme por toda la MP de la célula, pero en conjugación la endocitosis activa se detecta únicamente en la punta (**Figura 36B**) (Valdez-Taubas & Pelham, 2003). Todo indica que, durante el proceso sexual, la fuerte secreción polarizada hacia una zona muy concreta de la célula, se contrarresta con una endocitosis también polarizada. Sin embargo, la localización de Chs3p sugiere que esta proteína escapa a la regulación endocítica difundiéndose por la MP de la proyección.

2.3 Transporte polarizado de Chs3p y Chs4p

Si esta hipótesis fuera cierta, el transporte de Chs3p debe ser polarizado hacia la punta del *shmoo* y difundir a partir esa región. Por tanto, se transformó una cepa *chs3Δ* con un plásmido que expresaba *CHS3-GFP* bajo el control del promotor inducible *GALI*. Tras dos horas de inducción con factor α en un medio con rafinosa, se añadió galactosa y se comenzó a detectar la señal de fluorescencia. En los primeros momentos de inducción, Chs3p-GFP se localiza en la punta de la proyección, y gradualmente comienza a difundir por el resto de la MP de la proyección. Tras toda la noche de incubación en un medio con galactosa, Chs3p-GFP se encuentra únicamente en la MP de la proyección y no difunde hacia el resto de la célula, a pesar de ser un promotor de fuerte expresión. Por tanto, el transporte de Chs3p está polarizado hacia la punta y no difunde por el resto de la periferia celular (Resultados no mostrados).

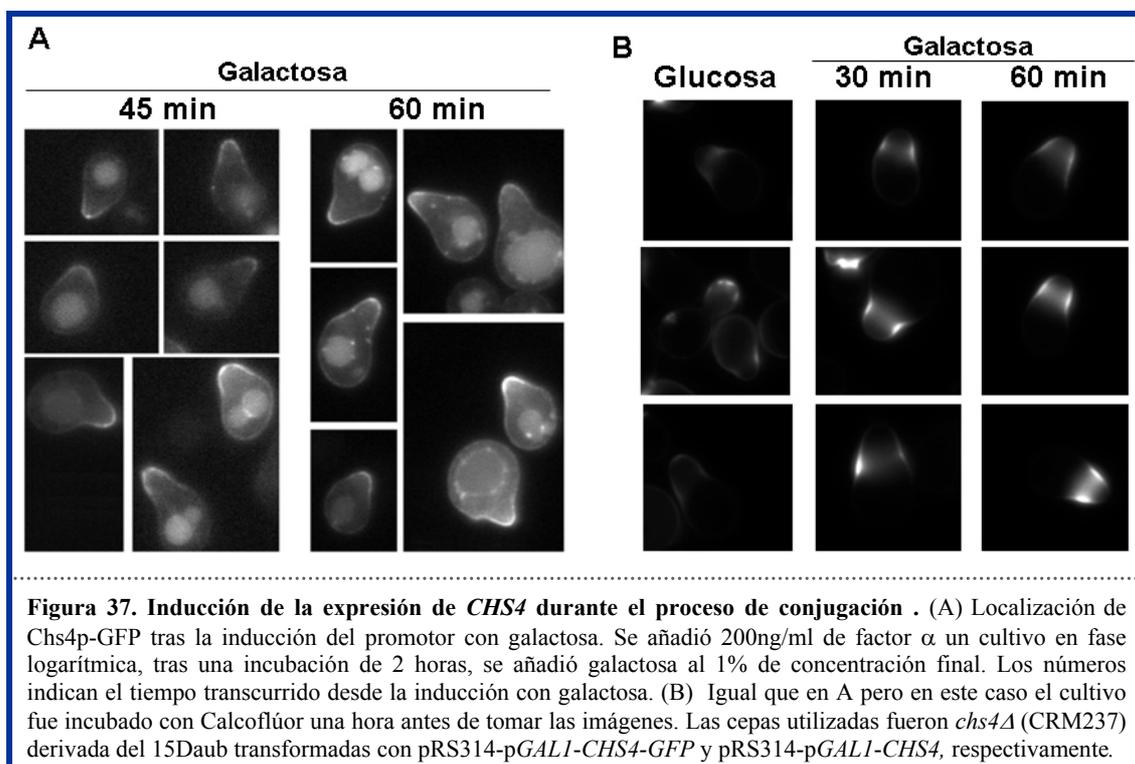


Figura 37. Inducción de la expresión de *CHS4* durante el proceso de conjugación . (A) Localización de Chs4p-GFP tras la inducción del promotor con galactosa. Se añadió 200ng/ml de factor α un cultivo en fase logarítmica, tras una incubación de 2 horas, se añadió galactosa al 1% de concentración final. Los números indican el tiempo transcurrido desde la inducción con galactosa. (B) Igual que en A pero en este caso el cultivo fue incubado con Calcoflúor una hora antes de tomar las imágenes. Las cepas utilizadas fueron *chs4Δ* (CRM237) derivada del 15Daub transformadas con pRS314-p*GALI-CHS4-GFP* y pRS314-p*GALI-CHS4*, respectivamente.

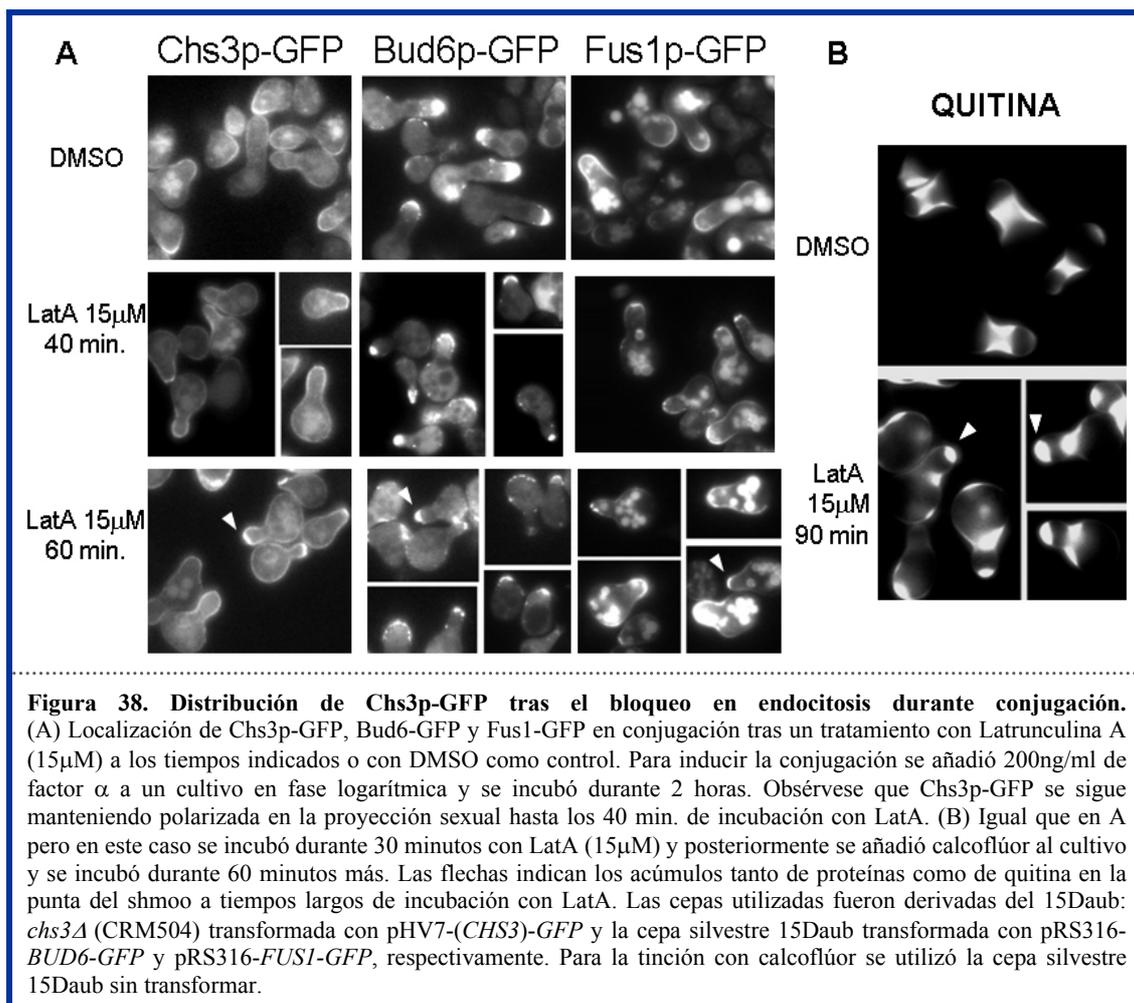
Este mismo ensayo con Chs4p-GFP, indicó que esta proteína también se polariza hacia la punta del *shmoo*. Como sabemos que Chs3p depende de Chs4p para ser activada, decidimos inducir la expresión de pGALI-CHS4 después de 2 horas de incubación con factor α , y a continuación detectar la síntesis de quitina mediante tinción con calcoflúor. A los 45 minutos de inducción con galactosa, Chs4p-GFP sólo se detecta en el extremo de la proyección y está ausente de la base del *shmoo* (**Figura 37A**). Sin embargo, la tinción con calcoflúor a los 30 minutos de inducción, indica que la quitina sólo se localiza en la base (**Figura 37B**). Este resultado sugiere que aunque Chs4p active virtualmente a Chs3p en la punta del *shmoo*, la síntesis masiva de quitina, la cual detectamos con calcoflúor, no ocurre hasta que la QSIII activada se acumula en este punto.

2.4 Bloqueo de endocitosis durante la conjugación

Como ya hemos visto, el bloqueo de la endocitosis en vegetativo provoca una difusión casi inmediata de Chs3p. Para determinar si se producía el mismo efecto en conjugación, tratamos los *shmoos* con Latrunculina A. La incubación durante 15 minutos con Latrunculina A (15 μ M) apenas alteraba la distribución polarizada de Chs3p-GFP en la MP de la proyección (**Figura 38A**), mientras que el mismo tratamiento en vegetativo tiene un efecto drástico en la localización de Chs3p-GFP (**Figura 31C**). A los 45 minutos de incubación con la droga, Chs3p todavía se mantiene polarizada, pero se empieza a acumular Chs3p-GFP en la punta del *shmoo*, fenómeno que se asocia con una deposición de quitina en esa región (**Figura 38B**) y que se acentúa con el tiempo. Este dato indica que mientras que el bloqueo de la endocitosis es inmediato, el transporte polarizado continúa durante cierto tiempo. La acumulación de Chs3p en la punta no es específica, sino que también ocurre con otras proteínas de transporte polarizado como son Fus1p-GFP, proteína implicada en la fusión de los *shmoos*, y Bud6p-GFP, marcador de polaridad. La tinción con FM4-64 confirma el bloqueo de la endocitosis tras el tratamiento con Latrunculina A, ya que en vez de acumularse en la punta, tiñe toda la MP del *shmoo* (Dato no mostrado). Fue imposible corroborar estos datos usando la cepa *end4Δ*, porque este mutante no responde apropiadamente al tratamiento con la feromona.

Por lo tanto, el bloqueo de la endocitosis en conjugación apenas altera la localización de Chs3p, lo que sugiere que el *turnover* endocítico de Chs3p durante la conjugación está reducido y por consiguiente, no es esencial a la hora de mantener a Chs3p correctamente polarizada.

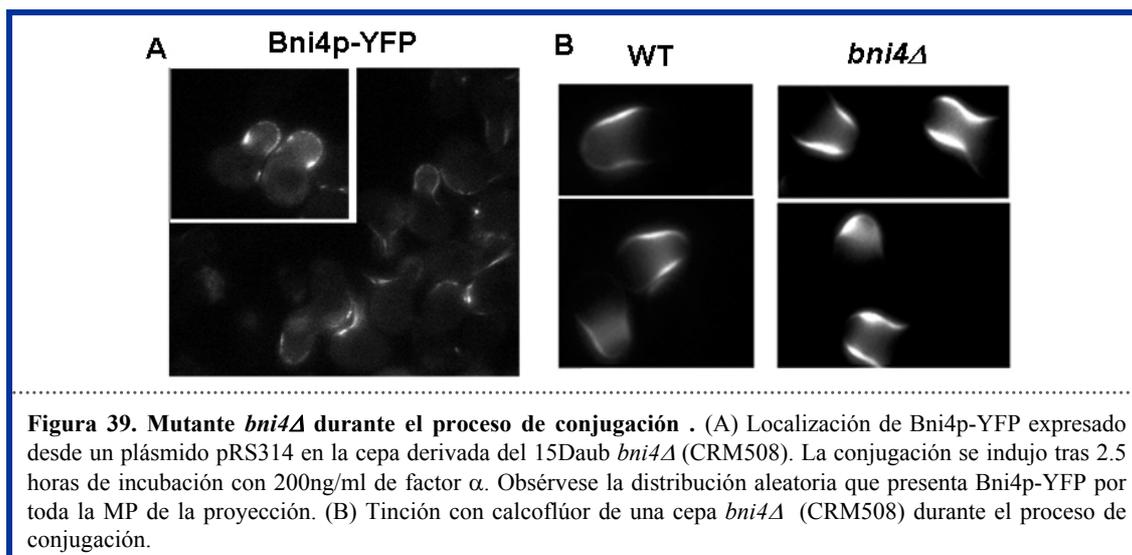
Cuando el mismo tratamiento con Latrunculina A se realiza en el mutante *chs4Δ*, no se observa una acumulación de Chs3p-GFP en la punta del *shmoo*. Aunque la interpretación de este resultado no es fácil, sí que es un indicio más de que Chs4p interacciona con Chs3p, modulando su estabilidad y/o su reciclaje endocítico.



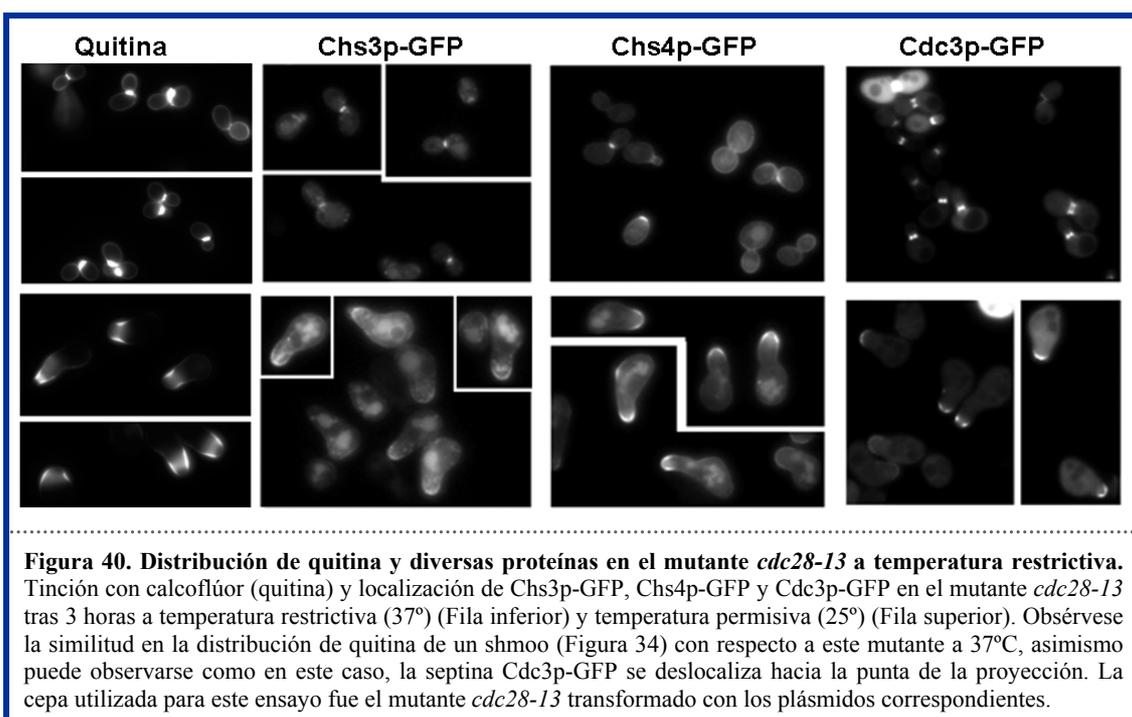
2.5 En conjugación, la localización de quitina es independiente de septinas

Durante el crecimiento vegetativo, la disposición de quitina depende de un anillo de septinas correctamente localizado y ensamblado (Schmidt et al., 2003), al que se uniría la QSIII a través de Bni4p (DeMarini et al., 1997). En conjugación, la localización de quitina no coincide totalmente con el complejo Chs3p/Chs4p, pero sí con las septinas, que se disponen en barras paralelas en la base de la proyección. Esta colocalización parecería indicar que el complejo QSIII se ancla también a las septinas durante el proceso de conjugación. Esta unión podría ser la responsable de activación, y por tanto, de la deposición de quitina en forma de banda difusa.

Como Bni4p es la proteína responsable del anclaje de Chs3/4p al anillo de septinas en vegetativo, procedimos a analizar su papel en conjugación. El mutante *bni4Δ* no presenta ningún defecto en conjugación, ni en la localización de quitina durante este proceso (**Figura 39B**). Por otra parte, el patrón de localización que presenta esta proteína parece aleatorio, observándose varios acúmulos a lo largo toda la proyección, y que además varía de célula a célula (**Figura 39A**).



Parecería por tanto, que Bni4p no participa en la localización de la QSIII durante la conjugación, cuestionando la interacción de la QSIII con las septinas. Por ello, con la intención de analizar el papel de éstas en la deposición de quitina durante el proceso de conjugación, utilizamos el mutante de ciclinas *cdc28-13*. Cdc28p es una de una de las principales quinasas dependiente de ciclo. El mutante *cdc28-13* a temperatura restrictiva, experimenta una parada en G1, cambia el patrón de crecimiento y las células muestran una morfología muy polarizada, que recuerda a los *shmoos*. Gracias a un análisis ya realizado por la Dra. Henar Valdivieso, sabíamos que la quitina en el mutante *cdc28-13* a 37°C, se localizaba en la base de la proyección de la misma forma que se dispone en conjugación (**Figura 40**). Además, el contenido en quitina aumentaba más de cuatro veces. Por tanto, en estas circunstancias parece



que se forman unas células similares a *shmoos*, pero en ausencia de feromona.

Chs3p-GFP y Chs4p-GFP se localizan correctamente polarizadas en la MP de la proyección a temperatura restrictiva de forma muy similar a lo que ocurre en conjugación. Pero sorprendentemente, en las células polarizadas del mutante *cdc28-13* a 37°C, la septina cdc3-GFP se localiza en la punta (**Figura 40**). Para confirmar la deslocalización de las septinas realizamos una inmunofluorescencia anti-cdc11p, y en este caso el fenotipo es mucho más drástico, porque prácticamente se pierde la señal de esta septina a 37°C. Esta cepa no presenta alteración en la localización de estas proteínas en vegetativo a temperatura permisiva, y la localización de las septinas y de Chs3/4p en el *cdc28-13* tras un tratamiento con factor α a 25°C es similar a la de una cepa silvestre (Datos no mostrados). Por tanto, podemos afirmar que en las células polarizadas del mutante *cdc28-13* a temperatura restrictiva, la deposición de quitina no depende de la localización de las septinas. Debido a la gran semejanza en la localización y cantidad de quitina, entre las células polarizadas de este mutante y los *shmoos* típicos de conjugación, podríamos extrapolar este resultado, asumiendo que, en conjugación, la localización de quitina también es independiente de la disposición de septinas.

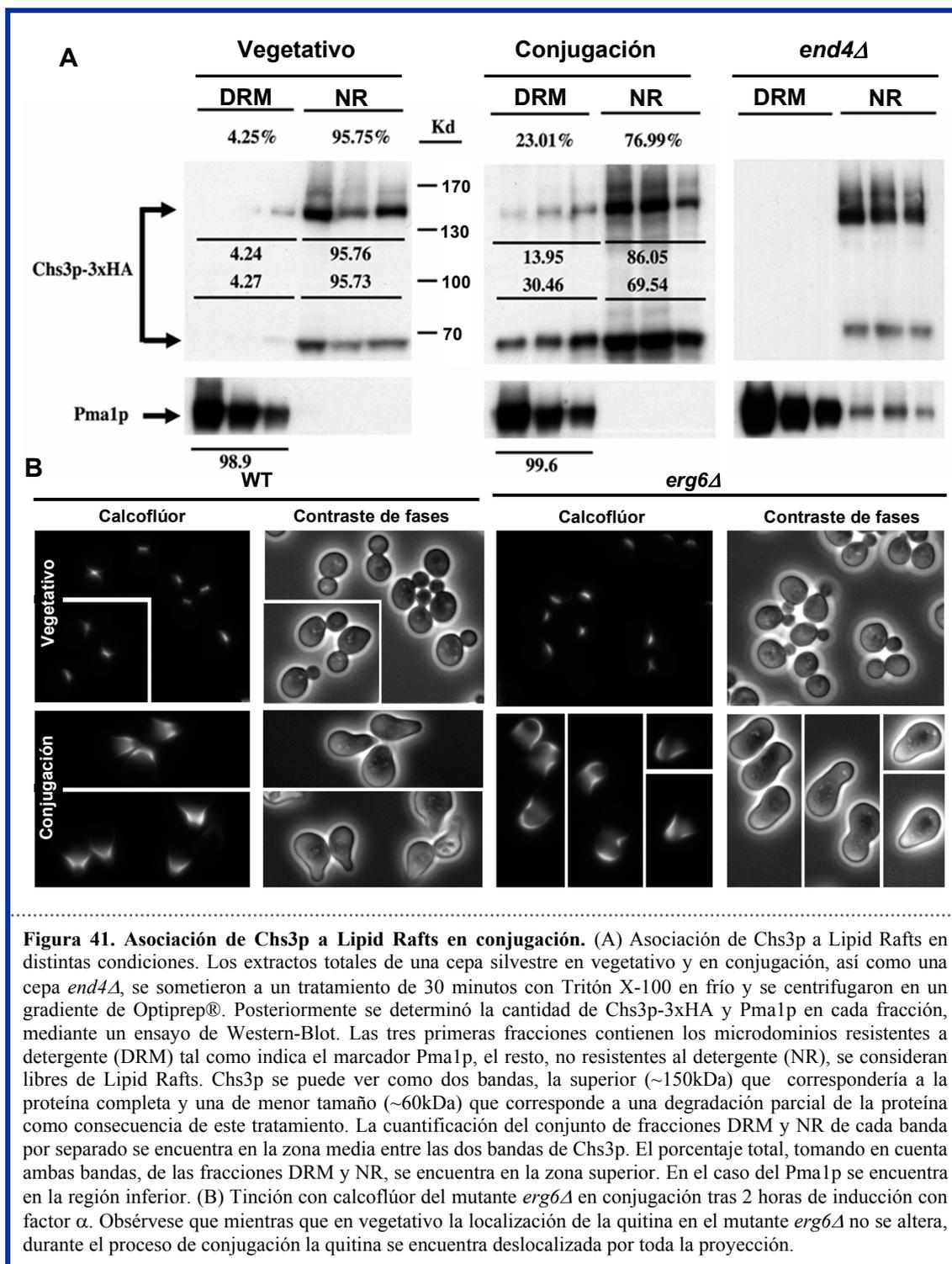
2.6 Asociación de Chs3p a Lipid Rafts en conjugación

Durante el proceso de conjugación, Chs3p está polarizada en la MP de la proyección y no difunde hacia el resto del contorno celular. Esta localización se mantiene incluso después de bloquear la endocitosis o sobreexpresando Chs3p, lo que sugiere la existencia de algún mecanismo de retención de Chs3p en la MP de la proyección. Ya que la disposición de septinas parece no afectar a la localización de quitina, decidimos abordar el estudio desde el punto de vista de la MP.

Se ha descrito que la MP de la prolongación es rica en ergosterol y presenta una ordenación mayor que el resto de la MP, lo que ha llevado a la conclusión de que en esa región se concentran los Lipid Rafts (balsa lipídica) (Jin et al., 2008; Proszynski et al., 2006).

La proteína específica de conjugación Fus1p, se mantiene correctamente localizada en la punta del *shmoo* gracias a su asociación con Lipid Rafts (Bagnat & Simons, 2002; Proszynski et al., 2006). Así que analizamos la asociación de Chs3p a Lipid Rafts durante la conjugación, ya que esto podría determinar su localización polarizada. Además, es posible que esta asociación fuera la responsable de la alteración del reciclaje endocítico de Chs3p.

Como se puede ver en la **Figura 41A**, Pma1p, una proteína ya descrita como asociada a Lipid Rafts, se localiza en las 3 primeras fracciones del gradiente, denominadas DRM (*Detergent Resistant Membranes*). Parece que el tratamiento con Tritón x-100 provoca que Chs3p-3xHA sea más sensible a las proteasas celulares, de tal forma que la proteína se degrada parcialmente, presentándose como dos bandas con distinto tamaño molecular. La superior (~150 KDa) corresponde a la proteína completa y la inferior (~60 KDa) al extremo C-terminal.



El extremo N-terminal correría como una banda de 75KDa no visible en este western (Datos no mostrados). Por tanto, teniendo en cuenta tanto la proteína completa como la procesada, observamos que aproximadamente el 23% de Chs3p durante el proceso de conjugación se encuentra asociada a Lipid Rafts (fracciones DRM), un porcentaje significativo ya que en vegetativo no llega al 5%, incluso con el bloqueo endocítico en el *end4Δ*. Este resultado

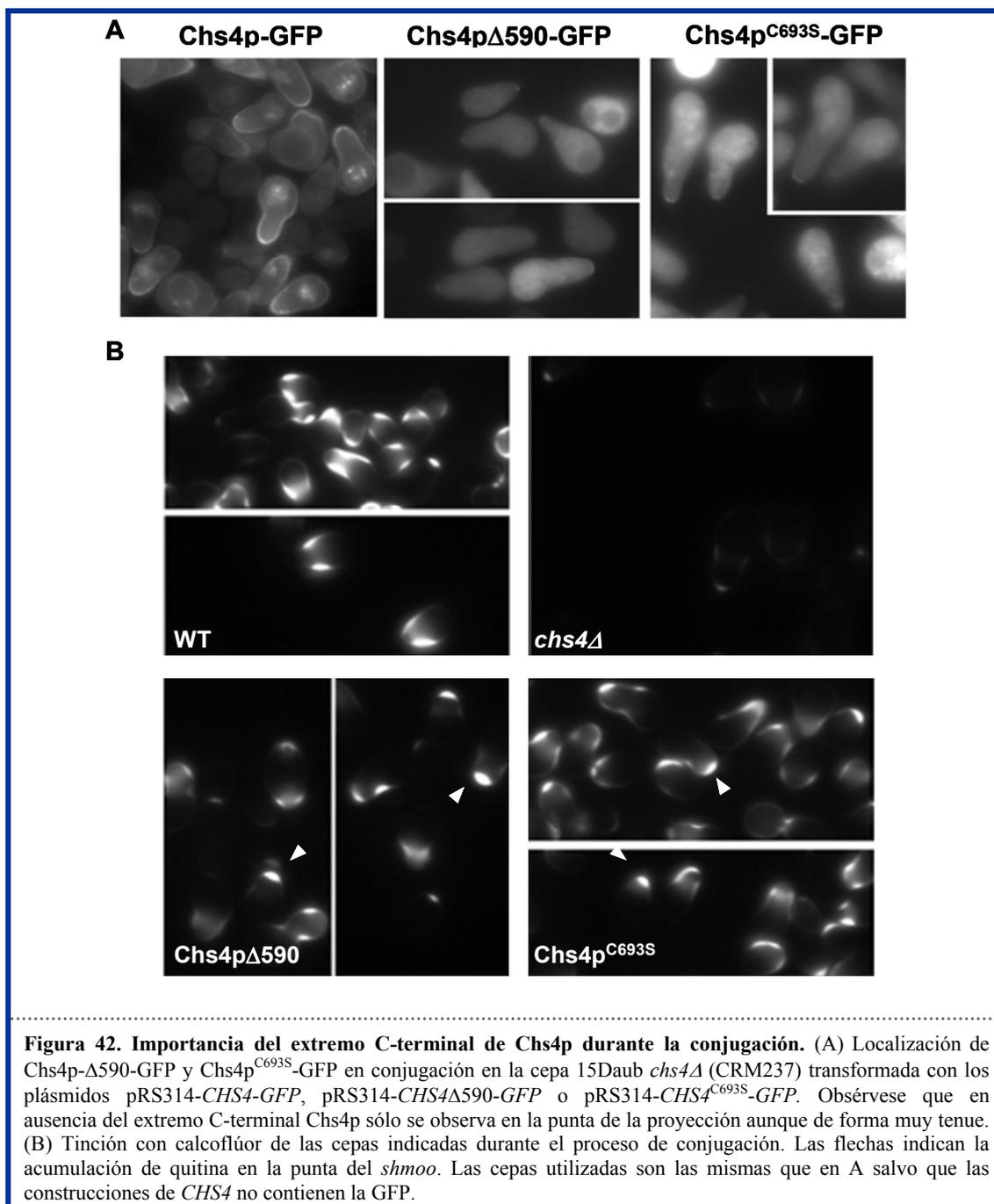
sugiere que una parte significativa de Chs3p se asocia a Lipid Rafts durante la conjugación. Esta circunstancia excepcional, podría ser un factor determinante, no sólo para evitar su difusión por toda la célula, sino también para su correcto *turnover* endocítico, o incluso su grado de activación.

Para verificar que realmente una parte significativa de Chs3p se encuentra asociada a Lipid Rafts en conjugación, y su posible relevancia biológica, decidimos analizar la localización de quitina en el mutante *erg6Δ*. Este mutante está afectado en la síntesis de ergosterol (Lees et al., 1995), y por tanto en la correcta formación de los Lipid Rafts (Bagnat et al., 2000; Bagnat & Simons, 2002). En la cepa *erg6Δ*, la asociación de distintas proteínas con los Lipid Rafts está alterada, incluso durante la conjugación, como ocurre con Fus1p (Bagnat & Simons, 2002). En vegetativo, la quitina en el mutante *erg6Δ* se localiza correctamente, sin embargo, en conjugación la quitina se encuentra muy deslocalizada por toda la MP de la proyección (**Figura 41B**). La deslocalización de quitina en el *erg6Δ* ocurre específicamente durante el proceso de conjugación, que es además la única condición fisiológica donde se detecta Chs3p asociado a Lipid Rafts. Por tanto, parece que alteración de los Lipid Rafts podría afectar a la localización de Chs3p enzimáticamente activa, y por consiguiente a la distribución de quitina. Sin embargo, hay que tener en cuenta que Erg6p participa en el proceso de respuesta a feromonas (Jin et al., 2008), y es posible que la deslocalización de quitina sea un efecto indirecto.

2.7 Chs4pΔ590 en conjugación

Como ya se ha mencionado, Chs4p-GFP se localiza en la MP de la proyección. Esta localización no depende de Bni4p y hasta el momento no se ha descrito ninguna proteína con la que interactúe en conjugación. Por tanto, su propia capacidad de asociación a la membrana podría ser un factor determinante para localizarse correctamente. Partiendo de esta premisa decidimos analizar Chs4p en ausencia de su extremo C-terminal, esencial para su correcta asociación a la MP, durante el proceso de conjugación.

En primer lugar, determinamos la localización de Chs4p-Δ590-GFP durante la conjugación. Como se puede ver en la **Figura 42**, en ausencia de su extremo C-terminal Chs4p ya no se localiza por toda la MP de la proyección, sino que se detecta, aunque con una señal muy débil, en la punta del *shmoo*. El mismo resultado se obtuvo con el Chs4p^{C693S}-GFP, con la diferencia de que se localizaba más frecuentemente en la punta y con un poco más de intensidad. Se comprobó que los niveles de proteína de ambas construcciones en conjugación eran similares a los silvestres. Este resultado sugiere que Chs4p-Δ590 y Chs4p^{C693S} son transportadas al extremo de la proyección, y una vez allí no son capaces de difundir por el resto de la MP, sin embargo, mantienen cierta localización en la punta. Sin embargo, estas proteínas no preniladas no están localizadas en el mutante *chs3Δ*, lo que indica que su localización depende mayoritariamente de su interacción con Chs3p (Datos no mostrados). Se



puede concluir, por tanto, que el dominio de prenilación es esencial para la correcta distribución de Chs4p en conjugación. En ausencia de prenilación, Chs4p depende mayoritariamente de Chs3p para su unión a la MP, de forma similar a lo observado en vegetativo.

Viendo que Chs4p- Δ 590 y Chs4p^{C693S} no se localizan correctamente, decidimos analizar la localización de quitina en estas cepas. Estos mutantes presentaban niveles de quitina casi silvestres, y sin embargo, esta quitina está deslocalizada, con una especial

acumulación en la punta (**Figura 42**), un fenotipo similar al observado tras el tratamiento con Latrunculina A. Por tanto, parece que la acumulación de Chs4p Δ 590 y Chs4p^{C693S} en la punta del *shmoo* conlleva a la síntesis de quitina en esa región.

Aunque el extremo C-terminal es prescindible para la síntesis y localización de quitina en vegetativo, sí que parece ser importante durante el proceso de conjugación. Es lógico si tenemos en cuenta que durante la formación de los *shmoos* ya no existe un anillo de septinas que ancle al complejo QSIII a través de Bni4p y por tanto, Chs4p depende más de sus propias señales para localizarse correctamente.

Con el fin de determinar, si la deslocalización de quitina provocada por la ausencia del extremo C-terminal de Chs4p, tiene alguna relevancia biológica, realizamos un ensayo de eficiencia de conjugación. Para este ensayo se utilizó un mutante *chs4* Δ transformado con un plásmido vacío o expresando, *CHS4* o *CHS4* Δ 590. Cada tipo sexual contenía un tipo de plásmido pero con marcadores diferentes (leucina y triptófano) de tal forma que tras la conjugación se seleccionaron los diploides que contenían ambos marcadores. En un mutante *chs4* Δ , la eficiencia de conjugación estaba notablemente reducida, 42.6% comparado con un silvestre (100%), como ya se había descrito (Trilla et al., 1997). La cepa Chs4p Δ 590 muestra un fenotipo intermedio con una eficiencia del 73%. Estos datos, media de tres experimentos independientes, sugerían que la eficiencia de conjugación de este mutante está significativamente reducida. Por tanto, parece que la ausencia del extremo C-terminal de Chs4p juega un papel determinante en conjugación, ya que no sólo afecta a la correcta localización de la proteína y a la síntesis de quitina, sino también en la eficiencia del proceso sexual.

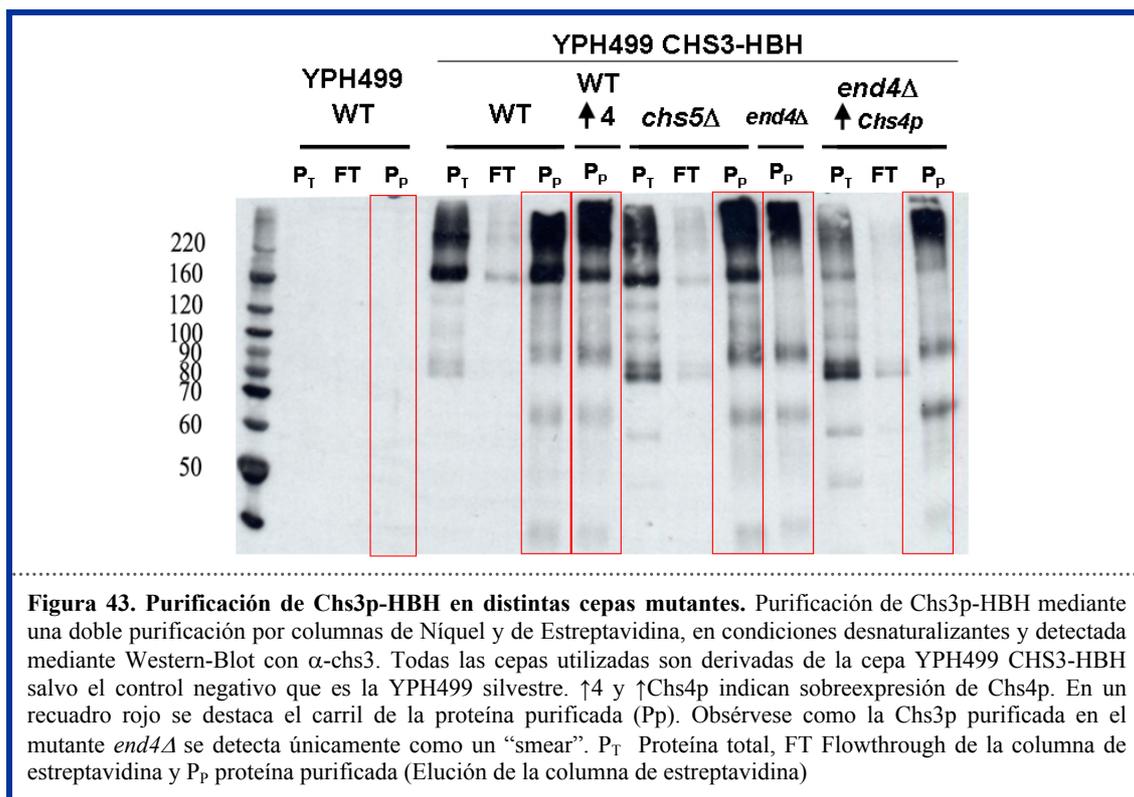
3. POSIBLES MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE Chs3p

A lo largo de este trabajo hemos demostrado que Chs4p participa en la estabilidad de Chs3p en la MP, regulando al mismo tiempo la activación de la QSIII. Aunque se ha especulado que dicha activación podría ser proteolítica, ningún dato experimental obtenido hasta la fecha corrobora este planteamiento (ver introducción). Una de las hipótesis más probable, es que Chs4p induzca algún tipo de cambio postraduccional en Chs3p, adquiriendo ésta una conformación catalíticamente activa. Como indican los resultados obtenidos en los estudios de la cepa Chs4p- Δ 590, parece que este cambio se induce al interaccionar físicamente con Chs4p, y que se mantiene tras la disociación de ambas proteínas. Las posibles modificaciones postraduccionales de Chs3p que trataremos a continuación, deben entenderse en su sentido más amplio, es decir, ya sea plegamiento, agregación de moléculas, modificaciones covalentes, etc...

3.1 Secuenciación por espectrometría de masas

Para determinar las posibles modificaciones postraduccionales de Chs3p se procedió a purificar la proteína y analizarla por espectrometría de masas (EM). Gracias a la inestimable ayuda de la Dra. A. Spang y de todo su grupo, en especial del Dr. M. Trautwein, pudimos embarcarnos en este proyecto, que de otra forma no hubiera sido posible. Para este fin, se utilizó una cepa cedida por la Dra. A. Spang, en la cual *CHS3* estaba marcada con dos colas de histidina y una de biotina en su extremo C-terminal (Chs3p-HBH). Este doble marcaje permitía una primera purificación por columnas de Níquel y otra por columnas de Estreptavidina, lo que reducía contaminantes en la muestra purificada. La purificación de Chs3p se realizó en condiciones desnaturalizantes de 8M de Urea para mantener las modificaciones covalentes que posteriormente serían detectadas por el espectrómetro de masas (Tagwerker et al., 2006).

En un primer momento realizamos una purificación a pequeña escala en distintas cepas para ver si detectábamos modificaciones en la proteína. Esto se determinó mediante un cambio de movilidad en gel. En un ensayo de Western-Blot, Chs3p se detecta como una doble banda. Se desconoce la relevancia biológica de este dato y se le ha atribuido a un problema artefactual en la carrera de la proteína (Cos et al., 1998). Tanto en la cepa que sobreexpresa *CHS4* como en el mutante *chs5 Δ* , se puede detectar un “smear” sobre la banda superior y la intensidad de la banda inferior disminuye (**Figura 43**), por lo que parece que en ambas cepas Chs3p ha sufrido modificaciones postraduccionales. En principio, no se podrían atribuir estas modificaciones postraduccionales a la activación de Chs3p, ya que en el mutante *chs5 Δ* la QSIII no es activa. Por tanto, todo apunta a que estas modificaciones son previas al bloqueo en el Golgi. Un caso llamativo, es el del mutante *end4 Δ* y el mutante *end4 Δ* con sobreexpresión de *CHS4*, en ambos casos, la banda inferior prácticamente desaparece y toda la proteína se detecta como un



“smear”. Esto sugiere que el bloqueo de la endocitosis mantiene una serie de modificaciones postraduccionales en Chs3p, que podrían ser esenciales para mantenerla en un estado activo.

Con la purificación a pequeña escala obtuvimos dos resultados importantes, uno era que el método en sí era eficaz para obtener Chs3p purificada, ya que la tinción con plata reveló muy pocos contaminantes en la muestra, y el otro eran los indicios de que Chs3p activa presenta una serie de modificaciones postraduccionales. Así pues, realizamos una purificación a gran escala, obteniendo suficiente cantidad de proteína para analizarla por EM.

En total, los péptidos recuperados del EM comprendían el 36% de la proteína total. Este porcentaje aumentaba hasta el 42% si eliminamos los potenciales dominios transmembrana de la secuencia, ya que recuperar los péptidos hidrofóbicos del EM es altamente improbable. El análisis de los péptidos recuperados reveló que las serinas 147 y 537, así como la treonina 148 se encontraban fosforiladas. Ya se había descrito en un análisis masivo de proteínas de membrana ubiquitinadas, que Chs3p presentaba ubiquitinación en la Lisina 136 (Peng et al., 2003) sin embargo, aunque nosotros recuperamos el péptido que contenía esta lisina, no detectamos signos de ubiquitinación.

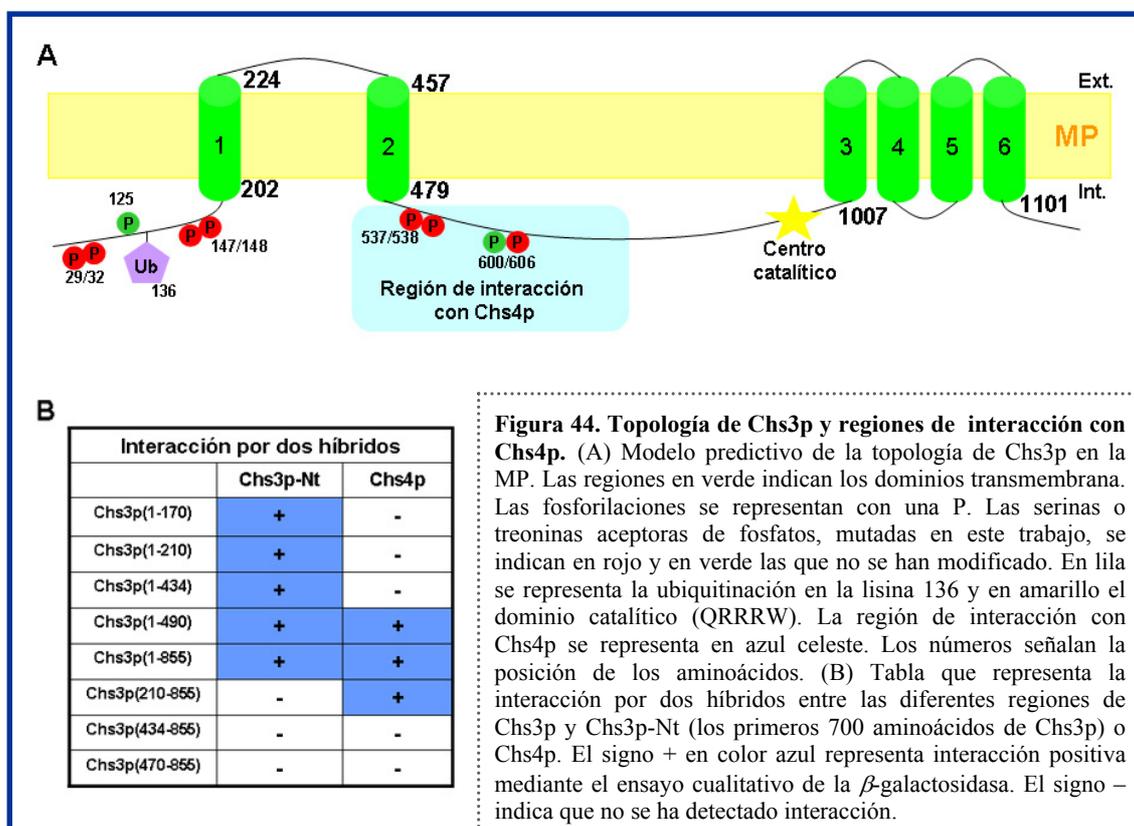
La ubiquitinación es una señal característica de endocitosis y degradación. En una cepa silvestre, la cantidad de Chs3p en la MP y por tanto, potencialmente ubiquitinada, es mínima. Por ello, decidimos analizar la secuencia de Chs3p por EM en un mutante *end4Δ*. Sin embargo, no se detectó ninguna modificación diferente a las ya anteriormente descritas para la cepa silvestre.

Al examinar Chs3p en la base de datos del EXPASY (<http://www.expasy.org/uniprot/P29465>), observamos que ya se habían determinado de forma experimental las fosforilaciones que obtuvimos en nuestro ensayo, e incluso había algunas fosforilaciones más: la treonina 537 y serina 606. Por otra parte, en el grupo de la Dra. A. Spang, el Dr. M. Trautwein purificó Chs3p-HBH, tras fijar con formaldehído para ver su interacción con otras proteínas, y determinó nuevos sitios de fosforilación de Chs3p en las Serinas 29, 32, 125 y 600 (Comunicación personal). Todos estos resultados se recogen en la **Figura 44A**.

3.2 Topología de Chs3p

Con los datos obtenidos por EM decidimos realizar un análisis de la posible topología de Chs3p en la MP. De esta forma podríamos relacionar la conformación estructural de Chs3p con una determinada regulación postraduccional.

La mayoría de los programas informáticos predicen varias posibles estructuras para Chs3p, que contienen entre 6 y 7 dominios transmembrana, quedando el centro catalítico hacia el interior celular, que sería lo esperable. Además, se ha detectado en un análisis masivo de la orientación de los extremos C-terminal de proteínas de membrana, que el extremo carboxilo de Chs3p se encuentra hacia el interior (Kim et al., 2006). Asimismo, unos resultados preliminares realizados por el Dr. M. Trautwein, sugieren que ambos extremos se orientan hacia el interior (Comunicación personal). Por otra parte, también mediante análisis masivo, se



ha detectado que Chs3p está ubiquitinada en la Lisina 136 (Peng et al., 2003), lo que indicaría que el extremo N-terminal de Chs3p debe estar orientado hacia el interior celular. En conclusión, todo apunta a que el inicio de la proteína se encontraría en la parte citosólica, y tras el conjunto de dominios transmembranales finales, el extremo C-terminal de la proteína también quedaría hacia el interior celular (**Figura 44A**). Esta posible topología de Chs3p se ajusta a los datos obtenidos por la EM, ya que todas las modificaciones postraduccionales coincidirían con regiones potencialmente orientadas hacia el citoplasma.

3.3 Regiones de Chs3p que interaccionan con Chs4p

Con un modelo más o menos aproximado de la posible topología de Chs3p, tratamos de determinar que regiones concretas de Chs3p interaccionaban con Chs4p. Además de la interacción con Chs4p, también se ha descrito que Chs3p interacciona consigo misma (DeMarini et al., 1997), un hecho que podría ser esencial para la correcta actividad de la QSIII. Por tanto, también determinamos que regiones de Chs3p son necesarias para la interacción con otras moléculas de Chs3p.

Se amplificó el gen *CHS3* mediante PCR, utilizando un oligonucleótido, que anillaba al inicio de la secuencia, y otro, que conteniendo un codón de parada, anillaba en distintas regiones del gen. Los fragmentos amplificados se clonaron en los plásmidos adecuados para la realización del ensayo de dos híbridos (PAS2 y PACT2), de tal forma que se obtenía una serie de proteínas Chs3p truncadas en el extremo C-terminal. Se determinó la interacción de estas proteínas, tanto con Chs4p como con Chs3p, mediante el ensayo cualitativo de la β -galactosidasa. En el caso de Chs3p se utilizó como control la proteína que contenía únicamente los primeros 700 aminoácidos (Chs3-Nt) porque con la proteína completa no se obtiene interacción positiva (DeMarini et al., 1997). Posiblemente, los dominios transmembrana del extremo C-terminal impidan el transporte de la proteína al núcleo.

De esta forma, se construyeron las siguientes construcciones de Chs3p: Chs3p(1-170), que abarca únicamente la región N-terminal citosólica, Chs3p(1-210), que contiene el primer dominio transmembrana, Chs3p(1-434), que además del dominio transmembrana contiene también la región hidrofílica, Chs3p(1-490), contiene los 2 primeros dominios transmembranas y Chs3p(1-855), que aparte de los 2 dominios también abarca la región hidrofílica que se situaría hacia el citoplasma.

Todas las proteínas truncadas de Chs3p interaccionaron positivamente con Chs3p-Nt (**Figura 44B**), incluso la construcción más corta Chs3p(1-171), por lo que la región de interacción de Chs3p consigo misma abarca, como mínimo, la región hidrofílica N-terminal. Por otra parte, las construcciones de Chs3p donde se detectó interacción positiva con Chs4p, fueron Chs3p(1-434), Chs3p(1-490) y Chs3p(1-855), lo que indica que la interacción entre ambas proteínas se sitúa en la región central de Chs3p.

Para seguir acotando la región de interacción de Chs3p con Chs4p, realizamos nuevas truncaciones de Chs3p. Esta vez, fuimos eliminando fragmentos del extremo N-terminal de Chs3p sobre la truncación Chs3p(1-855). Las nuevas construcciones abarcaban entre los aminoácidos 210-855, 434-855 y 470-855. Cuando analizamos la interacción de estas nuevas construcciones de Chs3p, vemos que ninguna interacciona con Chs3p-Nt, lo que acota la región de Chs3p que interacciona consigo misma a los primeros 170 aminoácidos. De hecho, confirmamos este resultado clonando únicamente esta región en ambos plásmidos y detectando interacción. Por tanto, esta región hidrofílica potencialmente situada hacia el interior celular, es la responsable de la interacción entre distintas moléculas de Chs3p. Este dato, junto con el obtenido mediante inmunofluorescencia de Chs3p-3xHA al tratar con Latrunculina A, sugiere que Chs3p podría estar formando unos agregados en la MP gracias a su interacción a través del extremo N-terminal. Una posibilidad muy atractiva sería que Chs4p estuviera regulando esta agregación, y por consiguiente, la correcta activación de la QSIII.

Únicamente la región entre los aminoácidos 210 y 855 de Chs3p, parece interaccionar con Chs4p, mientras que, con el resto de construcciones no se detecta un resultado positivo. Es sorprendente, pues esperaríamos una interacción positiva entre la construcción Chs3p(434-855) y Chs4p, ya que abarca la zona que sí interacciona en la construcción Chs3p(1-490). Así pues, es bastante probable que o bien estas construcciones, Chs3p(434-855) y Chs3p(490-855), se estén degradando en la célula, o bien no se pliegan adecuadamente y por tanto no interaccionan con Chs4p. Como en ambos casos no tenemos un control positivo, ya que no interaccionan ni con Chs3p ni con Chs4p, un resultado negativo no es concluyente.

Los datos que podemos extraer de este ensayo son que, Chs3p interacciona consigo misma en los primeros 170 aminoácidos y con Chs4p en la zona central de la proteína. Lo más probable es que sea entre el segundo y tercer dominio transmembrana, ya que estaría orientado hacia la cara citosólica (**Figura 44A**).

Hemos intentado corroborar estas interacciones mediante otras aproximaciones, como por ejemplo, la inmunoprecipitación, pero no hemos sido capaces de detectar interacción entre ambas proteínas. Incluso utilizando compuestos que estabilizan las uniones de forma irreversible (*crosslinking*) como el DSP. Todo esto sugiere que la interacción entre ambas proteínas es transitoria y minoritaria. Lo que coincide con el resultado obtenido en los gradientes, en el cual sólo una pequeña parte de Chs3p se encuentra en MP, que sería la que potencialmente interaccionaría con Chs4p.

3.4 Truncaciones en el extremo N-terminal de Chs3p

El ensayo de doble híbrido indica que varias moléculas de Chs3p interaccionan entre sí por el extremo N-terminal de la proteína. Así pues, nos planteamos la posible relevancia de esta unión y como podría afectar a la síntesis de quitina. Asimismo, en esa región se acumulan

una serie de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y ubiquitinación. Por tanto, construimos una serie de proteínas Chs3p delecionadas en su extremo N-terminal: $\Delta 63$ -Chs3p, $\Delta 126$ -Chs3p y $\Delta 194$ -Chs3p, que carecían de los 63, 126 y 194 primeros aminoácidos, respectivamente.

En primer lugar, analizamos la localización de estas proteínas truncadas. Como se puede ver en la **Figura 45A**, la deleción del extremo N-terminal provoca la retención de estas proteínas en el RE. Este fenotipo es mucho más acentuado en el caso de las truncaciones $\Delta 63$ -Chs3p-GFP y $\Delta 194$ -Chs3p-GFP, en las que prácticamente no se aprecia señal en el septo. En el caso de la $\Delta 126$ -Chs3p-GFP, una parte significativa se detecta a nivel del cuello, sin embargo esta proteína no se detecta en los puntos intracelulares característicos de la cepa silvestre. Por tanto, parece que la deleción del extremo N-terminal de Chs3p dificulta su salida del RE. Para tratar de revertir este fenotipo se sobreexpresó el gen *CHS7*, la chaperona específica de Chs3p que promueve su salida del RE. En estas condiciones, se reducía drásticamente la retención de estas proteínas truncadas en el RE, pasando $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p a localizarse en la zona del septo e incluso a detectarse en puntos intracelulares (**Figura 45B**). Cabe destacar que estas proteínas también se detectan, aunque con una señal muy tenue, por el resto de la MP. La construcción $\Delta 194$ -Chs3p, por su parte, se deslocaliza completamente, no apreciándose señal ni en el cuello ni en puntos intracelulares. Se confirmó mediante Western-Blot que todas estas

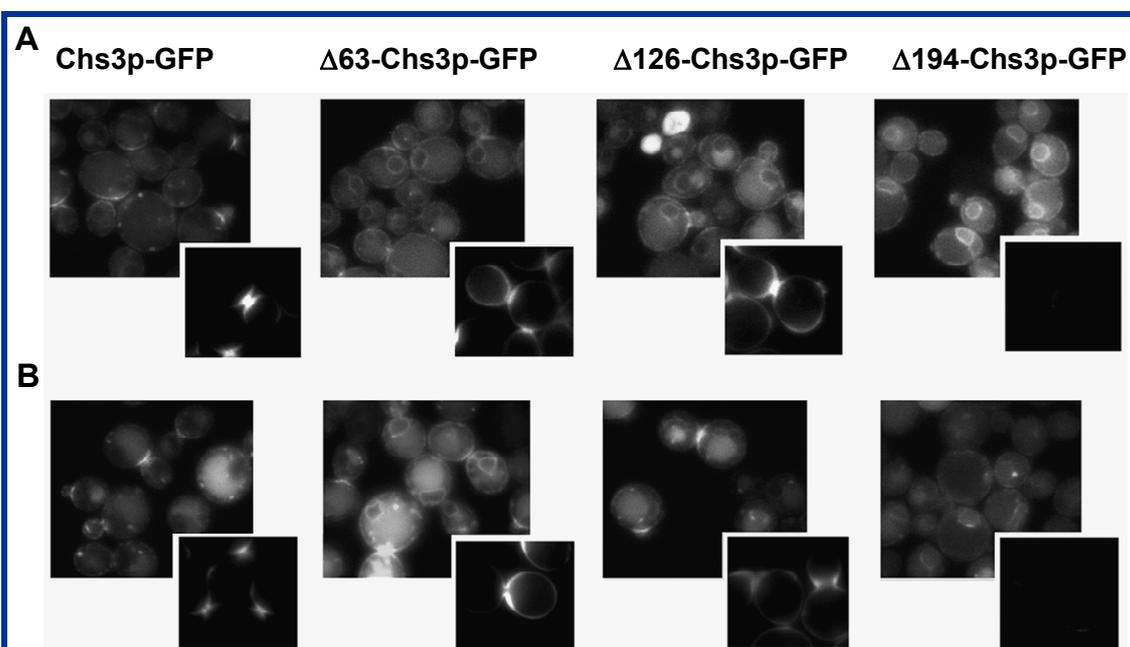
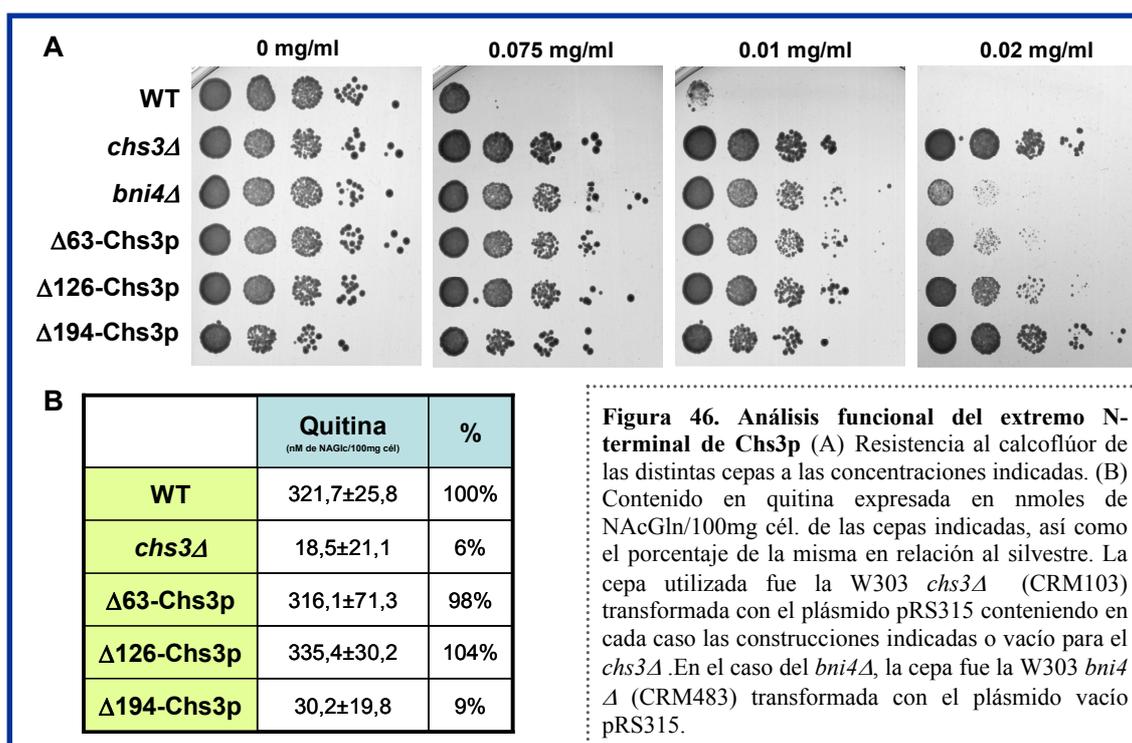


Figura 45. Análisis de las proteínas de Chs3p delecionadas en el extremo N-terminal. (A) Localización de las proteínas delecionadas en el extremo N-terminal de Chs3p (Imagen superior). Obsérvese que aunque la $\Delta 63$ -Chs3p-GFP y $\Delta 126$ -Chs3p-GFP quedan bastante retenidas en RE se puede observar algunas células con tinción en el septo, pero no en la $\Delta 194$ -Chs3p-GFP. Tinción con calcoflúor de las cepas indicadas (Imagen inferior). Véase como la quitina se deslocaliza hacia la yema hija en las cepas $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p. (B) Igual que en A pero con sobreexpresión de *CHS7*. Nótese que las proteínas mutantes ya no quedan tan retenidas en el RE. La cepa utilizada fue la W303 *chs3Δ* (CRM103) transformada con el plásmido pRS315 conteniendo en cada caso las construcciones arriba indicadas.

proteínas presentaban los mismos niveles intracelulares que la proteína silvestre.

Sorprendentemente, la tinción con calcoflúor refleja que las proteínas $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p son funcionales, ya que se detecta unos niveles de intensidad similares a los silvestres (**Figura 45A**). Sin embargo, la quitina de estas cepas se encuentra visiblemente deslocalizada, observándose por toda la PC además, en la región del septo, la quitina se encuentra desplazada hacia la yema hija, un fenotipo similar al mutante *bni4* Δ (Sanz et al., 2004). Esta tinción refleja una serie de defectos en la síntesis del septo, posiblemente como consecuencia de la malformación del anillo de quitina. La cepa $\Delta 194$ -Chs3p, como cabría esperar dada su falta de localización, no es funcional ya que no se observa tinción con calcoflúor.

Viendo que la cepa $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p eran funcionales, determinamos su contenido en quitina. Tal como refleja la tinción con calcoflúor, estas cepas presentan unos niveles de quitina similares a los de la cepa silvestre (**Figura 46B**). Pero sorprendentemente, cuando determinamos la sensibilidad de estas cepas al antifúngico calcoflúor, se observó que eran notablemente resistentes cuando se comparan con la cepa silvestre (**Figura 46A**). La cepa $\Delta 63$ -Chs3p complementa un poco mejor este fenotipo, ya que es ligeramente más sensible que la $\Delta 126$ -Chs3p, pero aun así ambas construcciones son significativamente resistentes. La cepa $\Delta 194$ -Chs3p, al ser no funcional, presenta la resistencia típica de un mutante *chs3* Δ . Por tanto, podemos concluir que las truncaciones del extremo N-terminal de Chs3p, al igual que ocurre con el mutante *bni4* Δ (Sanz et al., 2004), provoca un fenotipo de resistencia a calcoflúor a pesar de tener un contenido en quitina similar al silvestre. Así pues la resistencia al antifúngico



viene determinada no sólo por el contenido en quitina sino también por la distribución de la misma, siendo la zona del septo la región más sensible a la acción de este compuesto.

Con todos estos datos se puede concluir que la región N-terminal de Chs3p es esencial para su correcta exportación del RE, y en último término, para la correcta localización de quitina. Por tanto, esta región N-terminal hidrofílica tiene un papel clave en la regulación de la actividad QSIII, ya sea como consecuencia de las modificaciones postraduccionales, por su papel en la interacción entre distintas moléculas de Chs3p o por participar directa o indirectamente en su anclaje al cuello.

3.5 Análisis de la fosforilación y ubiquitinación de Chs3p

En vista de los resultados obtenidos por la EM y las bases de datos, decidimos mutar varios aminoácidos que estaban potencialmente fosforilados. Se mutaron los pares de serinas y/o treoninas en las siguientes posiciones: 29 y 32, 147 y 148, 537 y 538, 606 y 607. En todos estos mutantes se analizó la localización de quitina mediante tinción con calcoflúor, la resistencia a dicho antifúngico y la localización de las Chs3p-GFP mutadas. Ninguno de los mutantes, inclusive la combinación de todos ellos, presentaba un algún fenotipo diferente a la cepa silvestre (Datos no mostrados). En conclusión, las fosforilaciones en estos aminoácidos no son esenciales para la actividad o la localización de Chs3p.

Como ya se ha mencionado, en un análisis masivo de proteínas ubiquitinadas de membrana se detectó que Chs3p estaba ubiquitinada en la lisina 136 (Peng et al., 2003). Con el fin de determinar si esta ubiquitinación de alguna forma regulaba la actividad QSIII, se cambió la lisina 136 por una arginina mediante mutagénesis dirigida. La tinción con calcoflúor era bastante similar a la de un silvestre, sin embargo, este mutante (Chs3p^{K136R}) presentaba una ligera sensibilidad a calcoflúor que se correspondía con un leve incremento, de hasta un 10%, en la cantidad de quitina (Datos no mostrados). La localización de Chs3p^{K136R}-GFP era bastante similar a la de la cepa silvestre, es decir, concentrada en la zona del cuello, pero sí que se podía apreciar cierta difusión desde el septo (Datos no mostrados). Todos estos datos sugerían que el reciclaje endocítico de Chs3p^{K136R} estaba alterado y la proteína se endocitaba con menor eficiencia, por lo que su estabilidad en el cuello provocaría un aumento en la síntesis de quitina y por tanto mayor sensibilidad al calcoflúor. Sin embargo, debido a las pequeñas diferencias observadas, los resultados no son totalmente concluyentes.

A pesar de los resultados previos (Peng et al., 2003), todos nuestros intentos para demostrar que Chs3p está ubiquitinada han fracasado, estando pendiente la introducción de mejoras técnicas en los diferentes protocolos utilizados.

DISCUSIÓN



1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años se han ido caracterizando las distintas actividades QS de la levadura *S. cerevisiae* y aunque el grado de comprensión acerca de las mismas ha aumentado considerablemente, aún estamos lejos de conocer los mecanismos implicados, tanto en la regulación como en la acción de cada actividad. La quitina, al ser un compuesto esencial y específico del reino fúngico, constituye una atractiva diana en el desarrollo de nuevos antifúngicos de toxicidad selectiva. Esta nueva vía en el diseño de fármacos necesita irremediablemente de un profundo conocimiento en el proceso de síntesis de quitina.

La actividad QSIII es la responsable de la síntesis de la mayoría de la quitina *in vivo* en levaduras y, como ha quedado patente a lo largo de esta memoria, está sometida a un estricto control, tanto temporal como espacialmente. Con este simple hecho queda reflejada la importancia biológica de la síntesis de quitina a lo largo del ciclo celular de la levadura. Además, se puede encontrar en la literatura una gran cantidad de estudios centrados en el transporte intracelular de Chs3p, ya que, en estos últimos años, se ha incrementado su uso como modelo en la secreción y el reciclaje de proteínas de membrana.

Un aspecto llamativo de la actividad QSIII es su regulación durante dos etapas distintas del ciclo de vida: el crecimiento vegetativo y la conjugación. En primer lugar, cabe destacar, las funciones que desempeña la síntesis de quitina mediada por Chs3p en ambas etapas. Durante el ciclo vegetativo, Chs3p está implicada en la síntesis de quitina en las paredes laterales, que en respuesta a estrés puede constituir hasta el 20% del peso seco de la PC (Popolo et al., 1997), también está relacionada con la síntesis del septo de remediación en el caso de que la formación del septo primario esté comprometido (Cabib & Schmidt, 2003; Schmidt et al., 2002), y finalmente, su función más característica consiste en la síntesis del anillo de quitina, que ayuda a mantener la integridad del cuello durante la división celular (**Figura 47**) (Schmidt et al., 2003). De hecho, mantener la integridad, también parece ser la función propia de la quitina situada en la base de la proyección sexual, ya que se ha propuesto que constituye un refuerzo en la zona donde va a tener lugar la disolución de la PC para permitir la fusión celular (Schekman & Brawley, 1979).

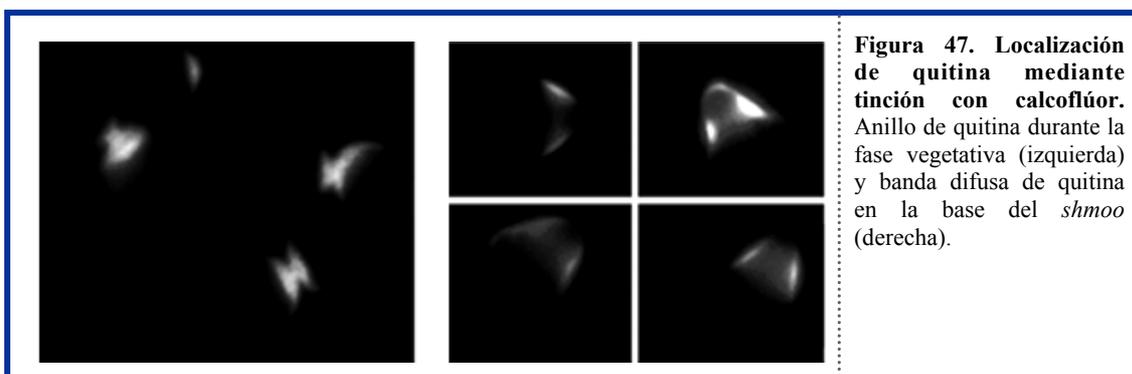


Figura 47. Localización de quitina mediante tinción con calcoflúor. Anillo de quitina durante la fase vegetativa (izquierda) y banda difusa de quitina en la base del *shmoo* (derecha).

En vegetativo y en conjugación, Chs3p parece estar regulada de forma específica. Sin embargo, hay que tener en cuenta que básicamente participan las mismas proteínas, tanto en su transporte como en su activación. En ambas etapas, la actividad QSIII depende de la secreción polarizada, el citoesqueleto de actina, y de las proteínas Chs4-7p. Aunque también existen elementos distintivos como son Bni4p y las septinas, puesto que mientras que en vegetativo son esenciales en la localización de quitina, en conjugación, su función parece prescindible (ver más adelante). Además, cabe destacar que en vegetativo Chs3p y Chs4p colocalizan con la síntesis de quitina, sin embargo, en conjugación, encontramos una región (la punta del *shmoo*) donde a pesar de detectarse ambas proteínas, la síntesis de quitina no se produce. Con todo ello, podemos pensar que, o la regulación de la actividad de la QSIII es distinta en ambas etapas, o bien es un mismo mecanismo de regulación expuesto a dos entornos completamente distintos. De hecho, tanto en vegetativo como en conjugación, el elemento común parece ser el *turnover* endocítico de la proteína que, como ha quedado demostrado a lo largo de esta memoria, es un elemento clave en la regulación de la actividad QSIII. Saber cuáles son los elementos que hacen que este reciclaje sea diferente en vegetativo y conjugación, es una cuestión que aún nos queda por resolver en el futuro.

Con todos estos datos, podemos afirmar que Chs3p es una proteína con una regulación postraduccional excepcional. Por un lado, en vegetativo reúne una serie de características particulares en cuanto a su transporte y reciclaje, puesto que se han descrito muy pocas proteínas de MP que sean recicladas y mantenidas en estado inactivo. Por otro, presenta un mecanismo de control distinto en vegetativo y en conjugación. Hasta la fecha, no se han descrito otras proteínas de MP que presenten un comportamiento tan diferente en las distintas fases del ciclo. De hecho, incluso durante la fase de esporulación, ha quedado establecido que Chs3p tiene un sistema de regulación específica. Esto hace de la subunidad catalítica de la QSIII un atractivo modelo no sólo en el transporte de proteínas, sino también por su regulación característica en cada fase del ciclo.

2. Chs4p ES NECESARIA PARA LA CORRECTA TRANSLOCACIÓN DE Chs3p EN LA MP

Estudios previos sugerían que la interacción física entre Chs3p y Chs4p en la región del septo podría ser la responsable de la activación de la QSIII (DeMarini et al., 1997; Trilla et al., 1997). Sin embargo, se desconoce como se lleva a cabo dicha activación, aunque sí se sabe que es independiente del anclaje a septinas a través de Bni4p (Sanz et al., 2004). Este hecho se debe principalmente a que Chs4p ha sido muy poco caracterizada, y hasta la realización de este trabajo, se desconocía su función en la regulación de la actividad QSIII.

2.1 El grupo prenilo de Chs4p no es esencial para su función

Nuestros datos indican que Chs4p es una proteína muy estable, asociada a membranas y que se transporta en vesículas polarizadas hacia la zona del septo. Una vez alcanza la región del cuello, comienza a difundir hacia el resto de la MP. Este transporte polarizado de Chs4p es independiente de Chs3p y del resto de la maquinaria implicada en la síntesis de quitina (Chsp). Esto sugiere que Chs4p posee sus propias señales para alcanzar la MP y que además, Chs3p y Chs4p son transportadas independientemente. Las vesículas que transportan Chs3p cosedimentan en un gradiente con las que transportan Chs4p, lo que dificulta mucho su aislamiento y análisis.

La llegada y anclaje de Chs4p a la MP también es independiente de Bni4p (Sanz et al., 2004), lo cual nos plantea la cuestión de cómo Chs4p permanece asociada a membrana en ausencia de dominios transmembrana o potenciales péptidos señal. El análisis de la proteína revela la existencia de un dominio de prenilación en el extremo C-terminal, que durante el desarrollo de este trabajo se demostró que era farnesilado *in vivo* (Grabinska et al., 2007). Aunque en este estudio especulan con un posible papel catalítico del grupo prenilo de Chs4p, lo cierto es que diversos grupos han demostrado que la delección del dominio de prenilación es prescindible para la correcta activación de la síntesis de quitina (DeMarini et al., 1997; Ono et al., 2000; Trilla et al., 1997). Las delecciones del extremo C-terminal de Chs4p realizadas en este trabajo, también corroboran los datos anteriormente probados.

Nuestros resultados, tanto bioquímicos como microscópicos, sugieren que la prenilación de Chs4p es el factor determinante en su asociación a la membrana. En su ausencia, Chs4p es incapaz de difundir a lo largo de la MP desde el septo, ya que, tanto el mutante Chs4p Δ 590 como Chs4p^{C693S} pierden su localización por la MP del contorno celular. Sin embargo, ambos mutantes permanecen localizados en la zona del septo y son funcionalmente activos, lo que nos indica que la situación es más compleja de lo que parece a simple vista. Todo parece sugerir, y de hecho, nuestros resultados así lo corroboran, que en ausencia del dominio de prenilación Chs4p se mantiene anclado al cuello gracias a su interacción con Chs3p y Bni4p. La interacción de estas dos proteínas con Chs4p es determinante para mantenerla correctamente localizada. Aunque ambas contribuyen a este efecto, los resultados obtenidos en la localización de Chs4p Δ 590-GFP en los mutantes *chs3 Δ* y *chs3 Δ bni4 Δ* , sugieren que la interacción con Chs3p juega un papel más relevante en la localización del Chs4p no prenilado. La asociación de Chs4p a membranas determina la estabilidad de la proteína, ya que cuando esta asociación se ve comprometida, la proteína se degrada en la vacuola. De hecho, este podría ser la causa de los bajos niveles de proteína detectados en la cepa Chs4p- Δ 530, ya que prácticamente no interacciona ni con Chs3p ni con Bni4p mediante el ensayo de dos híbridos (Datos no mostrados). Sorprendentemente, incluso en la cepa *chs3 Δ bni4 Δ* , se puede detectar una cantidad significativa de Chs4p- Δ 590-GFP asociada a la región del septo, todo esto nos indica la existencia de una compleja red de

interacción de Chs4p con las proteínas del cuello. En base a los análisis masivo de interacciones, se ha demostrado que Chs4p es capaz de interactuar con distintas proteínas, algunas de las cuales están relacionadas con la endocitosis y degradación de proteínas Atg1p, Yck1p e Yck2p (Ptacek et al., 2005).

En el análisis de resistencia a calcoflúor de las cepas Chs4p Δ 590 y Chs4p^{C693S} se observó que la cepa delecionada en el extremo C-terminal de Chs4p (Chs4p Δ 590) presenta una mayor resistencia al antifúngico que la que tiene mutado únicamente el sitio de prenilación (Chs4p^{C693S}). Esto se traduce en una menor capacidad funcional de la Chs4p Δ 590, lo que nos indica que el extremo C-terminal tiene propiedades adicionales a la mera prenilación. Una posibilidad muy atractiva sería que la deleción del extremo C-terminal de Chs4p esté afectando a la interacción global de la proteína con Chs3p, reduciendo la estabilidad de esta última en la MP (ver más adelante).

Como ya se ha mencionado, la deleción del dominio de prenilación de Chs4p elimina la asociación de la proteína a lo largo de la MP. Sin embargo, sigue siendo funcionalmente activa, presentando una quitina correctamente localizada. Por tanto, llegados a este punto, la incógnita era determinar el papel que desempeña Chs4p a lo largo de la pared lateral de la célula. Dado que la cantidad de quitina en los mutantes Chs4p Δ 590 y Chs4p^{C693S} se reducía en torno al 10% con respecto al silvestre y que esta es la cantidad de quitina estimada en las paredes laterales de la célula (Molano et al., 1980), nos planteamos la posibilidad de que la asociación de Chs4p a la MP fuera determinante para la activación de la síntesis de quitina lateral. Sin embargo, la tinción con WGA-FITC no detectó ningún defecto en quitina en los mutantes delecionados en el extremo C-terminal de Chs4p. Asimismo, tampoco se detectó ninguna hipersensibilidad ante diversas drogas que afectan a la PC. Todo esto nos llevó a la conclusión de que estas cepas no presentaban ningún defecto en la síntesis de quitina lateral. Aunque también es posible que los ensayos utilizados no sean lo suficientemente sensibles para detectar pequeñas diferencias en la composición de la pared celular.

Partiendo de la base de que Chs4p pudiera presentar otras funciones no relacionadas con la síntesis de quitina, analizamos diversos genes catalogados como sintéticos letales con *chs4 Δ* mediante un análisis masivo (Lesage et al., 2005; Tong et al., 2004). A favor de esta hipótesis se encontraron una serie de genes como *LST4* y *AST1*, que presentaban letalidad sintética exclusivamente con *chs4 Δ* (no con el resto de *chs Δ*), y que curiosamente estaban relacionados con el transporte intracelular de otras conocidas proteínas integrales de MP. Esto sugería un papel más general de Chs4p en la llegada o translocación de proteínas en la MP. Sin embargo, al construir los dobles mutantes *chs4 Δ ast1 Δ* y *chs4 Δ lst4 Δ* , observamos éstos eran totalmente viables, incluso en el mismo fondo genético donde se realizó el estudio (Lesage et al., 2005). Lo único que pudimos concluir, por tanto, es que el sistema empleado en el estudio masivo presentaba una serie de deficiencias que incrementaban artificialmente el número de interacciones letales. Con todo ello, no tenemos datos que invaliden la premisa de una posible

participación de Chs4p en los últimos pasos del transporte, regulando así la inserción de distintas proteínas de MP. Esto podría aportar una explicación evolutiva para la presencia de homólogos de Chs4p relativamente conservados, desde bacteria a humanos (Roncero, 2002).

2.2 La interacción entre Chs3p/Chs4p promueve la acumulación de Chs3p en la MP y la activación de la QSIII

Se había descrito que la interacción entre Chs3p y Chs4p es esencial para la correcta localización y activación de la QSIII (Ono et al., 2000; Trilla et al., 1997) sin embargo, esto no aportaba ningún tipo de información de cómo podría estar ocurriendo dicha activación. Ya que la activación por proteólisis no parecía ser el modo de acción, decidimos analizar otros posibles mecanismos en la activación de la QSIII mediada por Chs4p. Al observar que Chs3p-GFP se deslocalizaba del cuello en el mutante *chs4Δ* y que tendía a acumularse en vesículas intracelulares, nos planteamos la posibilidad de que en ausencia de Chs4p, Chs3p no se estuviera acumulando en la MP. Esta hipótesis, también se apoya en el patrón difuso que presenta Chs3p-3xHA mediante inmunofluorescencia, en el mutante *chs4Δ* (DeMarini et al., 1997). En este trabajo hemos demostrado que Chs3p se acumula parcialmente en vesículas intracelulares polarizadas pero nunca se detecta en la MP. Estas observaciones fueron confirmadas analizando la distribución de Chs3p en un fraccionamiento subcelular discontinuo de sacarosa, donde Chs3p no se localiza en las fracciones de MP en ausencia de Chs4p, pero la cantidad de Chs3p asociada a membrana aumenta considerablemente al sobreexpresar Chs4p. Por tanto, Chs4p es requerido para la acumulación de Chs3p en la MP.

Si además Chs4p actúa como un activador de Chs3p, tal como se ha propuesto (Choi et al., 1994b; Trilla et al., 1997), la acumulación de Chs3p en la MP dependiente de Chs4p debe ir asociada a un incremento en la actividad QSIII. Efectivamente, eso es lo que sucede, ya que cuando se mide la actividad QSIII en las distintas fracciones de un gradiente discontinuo, se puede observar que únicamente la Chs3p asociada a las fracciones de MP es la que presenta actividad enzimática, mientras que la Chs3p presente en los distintos compartimentos intracelulares no presenta actividad QSIII. Ya se había demostrado que la sobreexpresión de Chs4p aumenta la actividad QSIII casi al doble (Trilla et al., 1997), lo cual se corresponde muy bien con la cantidad de Chs3p que se acumula en la MP en estas condiciones. Además, existe una correlación entre el incremento de Chs4p y un aumento en la cantidad de quitina y la sensibilidad al calcoflúor. En este caso, el incremento en quitina es más leve, posiblemente debido a limitaciones metabólicas generales (Lagorce et al., 2002) junto con restricciones espaciales, ya que Chs4p no sólo activa sino que también localiza a Chs3p en la zona del septo, y es posible que la maquinaria de anclaje esté próxima a la saturación. De hecho, la sobreexpresión de Chs4p provoca una ligera dispersión de la quitina desde la región del septo, aunque la cantidad de quitina aumenta levemente.

Por tanto, podemos concluir que Chs4p promueve la acumulación de Chs3p en la MP al mismo tiempo que induce una activación de la actividad QSIII, confirmando así el papel que tradicionalmente se le había asignado a Chs4p como activador de Chs3p. Todo apunta a que ambas proteínas son transportadas de forma polarizada e independientemente la una de la otra hasta la zona del septo, y una vez allí interaccionan entre sí anclándose, a través de la interacción Chs4p-Bni4p, al anillo de septinas. No está claro, hasta ahora, como se asocian las versiones no preniladas de Chs4p a la maquinaria de secreción, pero ya hemos comentado que Chs4p parecería interaccionar con otras proteínas.

2.3 El reciclaje endocítico es un elemento clave en la regulación de la actividad QSIII

Teniendo en cuenta que Chs5p, Chs6p y Chs7p participan en el transporte anterógrado de Chs3p, todos los datos presentados hasta aquí apuntan a que Chs4p actuaba en el último paso de este proceso, permitiendo la llegada de Chs3p a la MP. De hecho, las vesículas polarizadas de Chs3p-3xHA que se observan en el mutante *chs4Δ* pero no en un mutante *chs5Δ*, inducían a pensar que Chs4p participa tras la salida de Chs3p del TGN. Tratamos de demostrar que Chs3p quedaba retenida en vesículas distintas en el mutante *chs6Δ* respecto al mutante *chs4Δ* sin embargo, la densidad similar de las vesículas dificultó mucho su diferenciación. Pese a ello, en la mayoría de los casos sí que se observaba un ligero desplazamiento de las vesículas de Chs3p en el mutante *chs4Δ*, lo que sugiere que ambos tipos de vesículas son diferentes. Para corroborar este resultado necesitaríamos un sistema más sensible en la caracterización de diferentes tipos de vesículas.

La sobreexpresión de la proteína Ypt32p así como la alteración del complejo AP-1 provocan una redirección en el transporte de Chs3p haciendo que alcance la MP en un estado funcional, incluso en ausencia de Chs5p y Chs6p. Sin embargo, en el mutante *chs4Δ* ni la sobreexpresión de Ypt32p ni la desestabilización del complejo AP-1, producen la llegada alternativa de Chs3p a la MP, y en ningún caso la activación de la QSIII. Por tanto, no es sorprendente que la activación de la ruta PKC, que es capaz de restaurar la síntesis de quitina en el mutante *chs6Δ* (Carotti et al., 2002), no tenga el mismo efecto en el mutante *chs4Δ*. Esto indica, que el requerimiento de Chs4p es imprescindible para la activación de la QSIII, y que esta proteína no es un mero paso más en el transporte de Chs3p, sino que su función es esencial e ineludible.

Una posible alternativa, es que la función de Chs4p estuviera relacionada con el reciclaje endocítico de Chs3p previamente demostrado (Holthuis et al., 1998; Ziman et al., 1996). Tradicionalmente, se había asumido que la inactivación de la actividad QSIII dependía de endocitosis, pero aún no se había demostrado experimentalmente. Nuestros datos confirman que la endocitosis es un proceso esencial en la regulación negativa de la actividad QSIII. La localización de Chs3p-GFP en un mutante bloqueado en este proceso (*end4Δ*), está

visiblemente alterada, distribuyéndose a lo largo de toda la MP y ausente en vesículas intracelulares. Asimismo, este mutante presenta unos altos niveles de actividad QSIII acompañados de un contenido en quitina tres veces superior al silvestre. Esto indica que una parte de Chs3p queda bloqueada en la MP en un estado enzimáticamente activo. La tinción con calcoflúor muestra una tinción irregular en este mutante, mientras que la distribución de Chs3p por la MP es uniforme, esto sugiere que otra parte de la Chs3p retenida en la MP podría estar inactiva. Estos resultados demuestran que Chs3p es inactivada mediante endocitosis a partir de la MP, una vez ha realizado su función.

Utilizando la droga Latrunculina A, también se obtenían los mismos fenotipos de deslocalización de Chs3p y de aumento en la síntesis de quitina. Por tanto, es posible, que la redistribución de Chs3p por la MP tras una subida a 37°C descrita por otros autores (Valdivia & Schekman, 2003), esté relacionada con una alteración del *turnover* de la proteína como consecuencia de la despolarización de la actina por el choque térmico (Delley & Hall, 1999).

¿Cuál es el papel de Chs4p en el proceso? El doble mutante *end4Δ chs4Δ* no muestra tinción con calcoflúor a pesar de que Chs3p se encuentra distribuida por toda la MP. El mismo resultado se obtuvo utilizando la Latrunculina A en el mutante *chs4Δ*. Esto confirma que en ausencia de Chs4p, Chs3p es capaz de alcanzar la MP, pero de forma biológicamente inactiva. El tratamiento a tiempos cortos con Latrunculina A muestra que en la cepa silvestre el gradiente de difusión de Chs3p comienza desde la zona del septo. Sin embargo, en ausencia de Chs4p, y por tanto sin posibilidad de que Chs3p se ancle al cuello, la difusión comienza desde la yema. Esta distribución coincide con el patrón polarizado de Chs3p en el mutante *chs4Δ* observado por inmunofluorescencia. Todos estos resultados indican que en el mutante *chs4Δ*, Chs3p alcanza la MP en un estado inactivo y es rápidamente endocitada. Por lo que parece bastante probable que Chs4p promueva la adquisición de una conformación activa y estable de la QSIII.

Uno de los resultados más llamativos es la activación de la QSIII en las paredes laterales de la cepa *end4Δ Chs4p-Δ590*. La delección del extremo C-terminal de Chs4p impide su asociación a la MP, por lo que no se detecta por el contorno celular de la MP incluso en el mutante *end4Δ*, sin embargo en estas circunstancias, la tinción con calcoflúor refleja que sigue existiendo síntesis de quitina lateral. Esto nos indica que Chs3p, tras ser insertada en el cuello en un estado activo, gracias a su interacción con Chs4p, es capaz de mantenerse activa independientemente de Chs4p hasta su endocitosis. Esto aboga por un posible cambio conformacional inducido por Chs4p y una posterior disociación de ambas proteínas.

Otro resultado sorprendente, y de difícil interpretación, es la activación parcial *in vitro* de la QSIII en el mutante *end4Δ chs4Δ*. Sabemos que en este mutante, Chs3p queda retenida en MP, aunque inactiva *in vivo*. Una posible explicación, es que aunque Chs3p esté en un estado inactivo, al estar inserta en la MP, su dominio catalítico sea más accesible al sustrato, y

que de alguna forma el procesamiento *in vitro* de las muestras permite detectar cierta activación de la QSIII. De esta misma forma, se explicaría por qué en el mutante *chs4Δ* no se detecta nunca esta activación *in vitro*. Ya que en este último caso, Chs3p quedaría retenida en vesículas intracelulares con una conformación que, a priori, no permitiría el acceso al sustrato y por tanto no detectaríamos actividad QSIII. Este modelo podría explicar incluso la zimogenicidad de la actividad QSIII, ya que la adición de tripsina a las muestras podría estar provocando algún tipo de alteración, ya sea en las membranas o en la propia Chs3p, con la consiguiente exposición del centro catalítico de la enzima y por tanto con capacidad sintética *in vitro*.

Las propiedades enzimáticas de Chs3p se ven alteradas en la cepa *end4Δ chs4Δ*, presentando mayor K_m que se traduce en una más baja afinidad por el sustrato. Esto sugiere que el centro catalítico de la enzima en ausencia de Chs4p es diferente, lo que apoya la teoría de que Chs4p es un inductor del correcto plegamiento de Chs3p. No obstante, debemos mantener la puerta abierta a otras posibles explicaciones ya que no se ha podido correlacionar fehacientemente la actividad QSIII *in vitro* con la síntesis de quitina *in vivo*.

¿Cuál es el papel que desempeña Chs4p en la regulación de la actividad QSIII? Nuestros datos indican que Chs3p y Chs4p se transportan independientemente y de forma polarizada. Así pues, se favorece la interacción de ambas proteínas a nivel del cuello, promoviendo la estabilización de Chs3p en la MP junto con la activación de la QSIII. Por tanto, cabe destacar que un transporte polarizado y un recambio endocítico continuo, junto con la baja difusión lateral por el anclaje a la maquinaria del septo, es lo que mantiene a Chs3p correctamente localizada en el cuello. Todo ello, determina una síntesis restringida del anillo de quitina. El conjunto de todos estos elementos es el responsable de la correcta localización de Chs3p, y cuando uno de ellos se ve alterado, se produce un defecto en la distribución de Chs3p y por tanto en la síntesis de quitina. Por ejemplo, en el mutante *bni4Δ*, el complejo Chs3/4p no se ancla apropiadamente al anillo de septinas, lo que provocaría un aumento de la difusión lateral que desequilibra el *turnover* endocítico de Chs3p, produciéndose así la síntesis ectópica de quitina (Sanz et al., 2004). De igual forma, cuando se produce un bloqueo en la endocitosis, Chs3p comienza a difundir rápidamente desde el septo a pesar de que Bni4p y la maquinaria del septo se mantienen correctamente posicionadas. Basándonos en todos estos datos, podemos concluir que la función de Chs4p en el mantenimiento de Chs3p en la MP está directamente relacionada con su función de anclaje al cuello. Este anclaje posiciona a la QSIII junto a la maquinaria endocítica favoreciendo su *turnover* (ver también conjugación). Asimismo, un incremento en la cantidad de Chs4p produce una mayor estabilidad de Chs3p a nivel del septo, con el consecuente aumento en la actividad QSIII. Todo este incremento, satura la maquinaria de anclaje del septo, lo que puede favorecer una ligera difusión lateral de la QSIII activa y la dispersión física de la síntesis de quitina alrededor del cuello (**Figura 24**).

En un trabajo previo, se había demostrado que Shc1p es el activador específico en esporulación de la QSIII (Sanz et al., 2002). Durante esta etapa, Shc1p sustituye la función de

Chs4p, ya que esta última es rápidamente degradada en esta fase del ciclo. Ambas proteínas comparten un elevado porcentaje de identidad en la región central de Chs4p, descrita como necesaria para su interacción con Chs3p. Cuando se sobreexpresa Shc1p en vegetativo en el mutante *chs4Δ*, esta proteína es capaz de promover la síntesis de quitina, sin embargo, se encuentra deslocalizada. Se ha demostrado que los dominios SLR, presentes en la región central de Chs4p, son los responsables de su interacción tanto con Chs3p como con Bni4p. Los dominios SLR son repeticiones entre 36 y 44 aminoácidos que adquieren una conformación en α -hélices característica. Estos motivos se han identificado en numerosos organismos desde bacteria hasta humanos, y aunque las proteínas con dominios SLR poseen diferentes funciones celulares, todas ellas parecen participar como proteínas adaptadoras en la formación de complejos multiproteicos (Mittl & Schneider-Brachert, 2007). Chs4p posee 7 dominios SLR agrupados en 2 α -hélices, mientras que su homólogo en esporulación Shc1p sólo contiene 4 dominios SLR que conforman una única α -hélice. Por tanto, se ha propuesto que Shc1p haya perdido los dominios SLR que posibilitan su interacción con Bni4p, aunque sigue conservando los de interacción con Chs3p (Sanz et al., 2002). De esta forma, la expresión de esta proteína en vegetativo mimetizaría el efecto de Chs4p, estabilizando la QSIII en la MP en una forma activa. Sin embargo, es incapaz de mantener a Chs3p anclada a la maquinaria del septo, lo que favorece su difusión lateral, con la consecuente deslocalización de quitina por las paredes laterales. Todo esto demuestra una vez más, el delicado equilibrio que mantiene a Chs3p correctamente localizada en la zona del septo, y que la más mínima alteración tanto en su estabilidad en la MP como en su anclaje, predisponen a una deslocalización en la síntesis de quitina.

¿Cual es la función concreta que realiza Chs4p sobre Chs3p? Aunque aún no tenemos una respuesta a esta pregunta, nuestros resultados contradicen la hipótesis de que Chs4p actúe como parte catalítica de Chs3p, tal como ha sido propuesto por algunos autores (Grabinska et al., 2007). Todos los datos parecen indicar que Chs4p induce una modificación postraduccional de Chs3p, responsable final de la estabilización y activación de la QSIII. Además, los resultados obtenidos sugieren que esta modificación permanece tras el bloqueo en endocitosis y que no requiere de la continua interacción con Chs4p. En ausencia de Chs4p, Chs3p se puede mantener en la MP bloqueando el proceso de endocitosis, pero no presenta actividad QSIII, probablemente debido a una inapropiada conformación de la proteína. Mediante ensayos de digestiones controladas con tripsina, hemos detectado que Chs3p es más sensible al tratamiento en un mutante *end4Δ* que en un silvestre (Datos no mostrados), lo que sugeriría que el plegamiento de esta proteína es diferente en ambos casos. Con este mismo sistema de digestiones con tripsina, se ha demostrado que distintas proteínas mutadas de Pma1p presentaban plegamientos alterados en la MP (Liu et al., 2006). De esta forma, podríamos concluir que cuando Chs3p se encuentra retenida en la MP (*end4Δ*) posee una conformación enzimáticamente activa, mientras que en un silvestre donde la mayoría de Chs3p se encuentra en vesículas intracelulares, la conformación sería la característica de un estado inactivo. En un mutante *chs4Δ*, por su parte, Chs3p siempre permanecería en un estado de

plegamiento inactivo e inestable, con lo que sería rápidamente endocitada y nunca se detecta en membrana. Se han descrito una serie de mutantes termosensibles de la ATPasa de membrana, Pma1p, que son capaces de alcanzar la MP pero en un estado conformacional alterado, de tal forma, que tras su inserción en la membrana son endocitados y degradados en la vacuola (Gong & Chang, 2001; Liu et al., 2006). Debido al hecho de que Chs3p es una proteína muy estable intracelularmente y que nunca se han detectado condiciones en las que se degrade, podríamos asumir que estamos ante el mismo mecanismo de control, pero que en el mutante *chs4Δ*, tras ser endocitada pase a residir nuevamente en vesículas del TGN. Esta hipótesis no ha podido ser confirmada experimentalmente al carecer de formas sensibles y específicas para diferenciar la Chs3p presente en la MP o en el TGN.

Cuando se bloquea la endocitosis, Chs3p queda retenida en la MP presentando un patrón punteado muy característico. Esta distribución es más aparente al realizar una inmunofluorescencia indirecta sobre un cultivo tratado con Latrunculina A, posiblemente porque la fijación con formaldehído evite la constante difusión de la proteína. Este patrón punteado se relaciona tradicionalmente a proteínas de membrana asociadas a Lipid Rafts. Sin embargo, cuando realizamos el ensayo bioquímico para determinar esta posible asociación observamos que esta proteína no se encuentra asociada a ellos. No obstante, hay que tener en cuenta que las condiciones en las que trabajamos no son del todo fisiológicas, y que es posible que el tratamiento con la Latrunculina A altere la asociación de Chs3p a estos microdominios. De hecho las condiciones óptimas de estudio serían en una cepa silvestre sin tratar, pero en este caso la cantidad de Chs3p asociada a MP y potencialmente incorporada en Lipid Rafts es inferior al 10%. Por todo ello, no podemos descartar una posible asociación de Chs3p a estos microdominios de MP, y que esta asociación fuera determinante en la activación y reciclaje de la proteína. Un ejemplo que se puede encontrar en la literatura lo constituye la aminoácido-permeasa de MP, Gap1p. Esta proteína cuando no se incorpora adecuadamente en los Lipid Rafts, es redirigida hacia la ruta de degradación vacuolar. Un dato llamativo es que Gap1p depende de Ast1p (descrita como sintético letal con *CHS4*), para ser incorporada eficientemente en estos microdominios. Centrándonos nuevamente en la QSIII, podríamos proponer una hipótesis un poco arriesgada, que consistiría en que la incorporación de Chs3p a los Lipid Rafts fuera dependiente de Chs4p, lo que a la postre determinaría su activación y estabilidad en la MP.

Puesto que es bastante probable que la regulación de la actividad QSIII por parte de Chs4p sea mediante una modificación postraduccional activadora y estabilizadora, nos planteamos si era posible activar a la Chs3p ya insertada en estado inactivo en la MP. Para responder a esta cuestión pusimos *CHS4* bajo el control del promotor *GALI*, lo expresamos en la cepa *end4Δ chs4Δ* y realizamos una tinción con calcoflúor. De esta forma detectamos que, tras la inducción de *CHS4*, la síntesis de quitina se iniciaba en el cuello y no en las paredes laterales. Sin embargo, esto no excluía ninguna posibilidad ya que la secreción de Chs4p es polarizada. Así pues, nuestro siguiente paso fue inducir *CHS4* en los mutantes *sec*, que tienen la secreción polarizada alterada. Sin embargo, este ensayo fue inviable porque la adición de

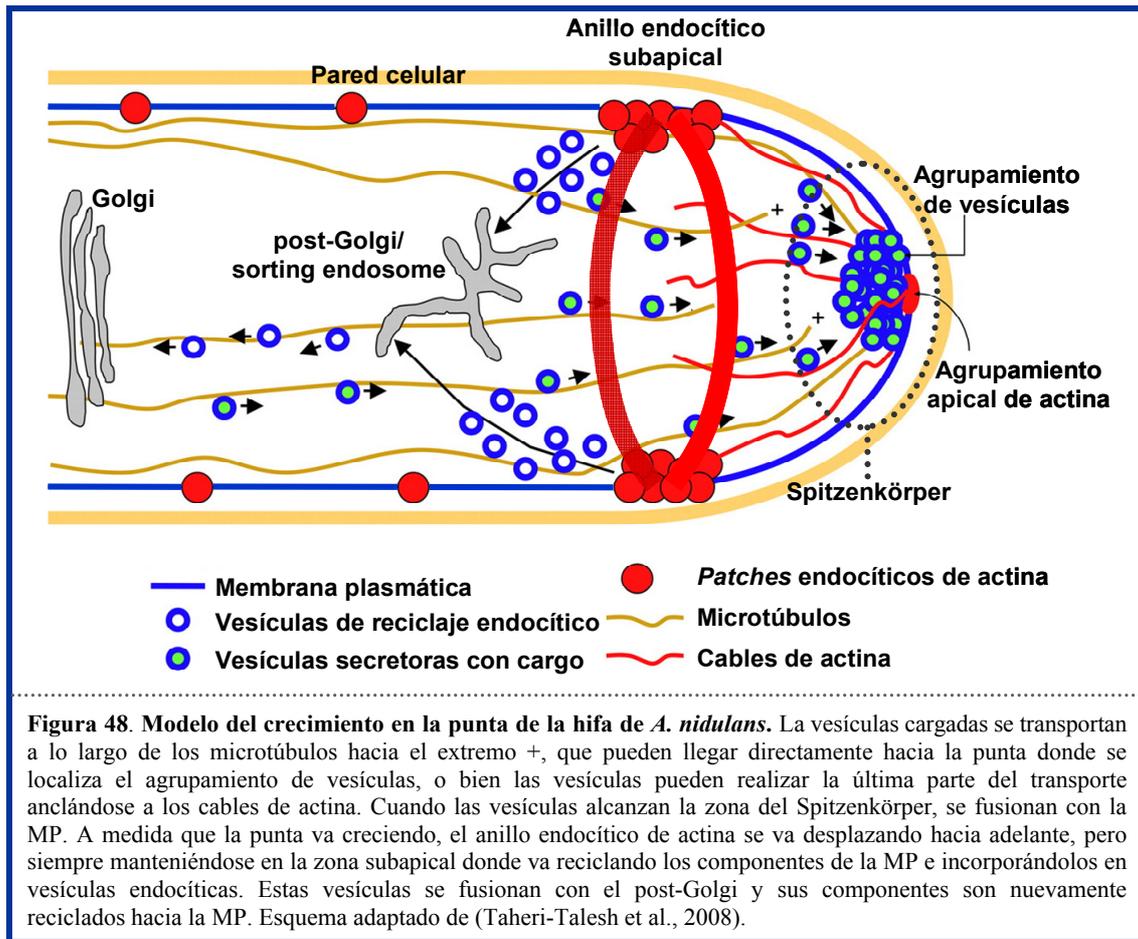
galactosa al medio suprime los defectos en secreción de estos mutantes.

3. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD QSIII EN CONJUGACIÓN

Nuestros resultados demuestran que durante la fase sexual del ciclo, Chs3p se acumula en la MP tanto en un silvestre como en una cepa *chs4Δ*. Por tanto, durante la conjugación y a diferencia de lo que ocurre en vegetativo, Chs3p se localiza en membrana ya sea en un estado activo o inactivo. Basándonos en el modelo de regulación que ocurre en vegetativo, parecería como si durante esta etapa del ciclo existiera un desequilibrio entre el transporte anterógrado y la endocitosis de la proteína. Cuando nos fijamos en cómo se encuentran ambos procesos, podemos observar que el transporte anterógrado está hiperpolarizado hacia la punta, y la endocitosis también se encuentra focalizada en esa región. Snc1p es una v-SNARE que participa en la fusión de las vesículas secretoras a la MP y comparte similitudes con Chs3p al ser una proteína que sufre reciclaje endocítico. Se ha descrito que esta v-SNARE se mantiene correctamente localizada en la punta de la proyección gracias a un adecuado *turnover* endocítico favorecido por una baja difusión lateral (Valdez-Taubas & Pelham, 2003). Sabemos que Chs3p se polariza hacia la punta, por lo que la única explicación que nos queda según este modelo, es que escape al reciclaje endocítico pasando a residir no sólo en la punta, sino por toda la proyección del *shmoo*.

En la hifa en crecimiento de los hongos, se ha descrito una estructura denominada “Spitzenkörper” (Spk), que consiste, en un gran complejo multivesicular localizado en la punta. Esta macrocomplejo se puede detectar al microscopio de contraste de fases, observándose como una masa oscura formada por vesículas. En el hongo filamentoso *Aspergillus nidulans*, se ha descrito un modelo para el Spk, en el cual la secreción polarizada está dirigida hacia la punta mientras que la endocitosis se produce en una zona subapical determinado por un anillo de actina (**Figura 48**) (Taheri-Talesh et al., 2008). Aunque *S. cerevisiae* no forma hifas verdaderas, la forma de polarización y crecimiento recuerda a la formación del *shmoo*. Por lo que si asumimos un modelo parecido para lo que ocurriría en la elongación de la proyección sexual de *S. cerevisiae*, podríamos especular que Chs3p es fuertemente polarizada hacia la punta, y no sería hasta la zona subapical donde sería endocitada. Todo parece indicar que la endocitosis en este caso es deficiente, por lo que parece que la cantidad de Chs3p que es transportada hacia la punta desborda a la capacidad endocítica en esa zona tan concreta, escapando una parte de ella a la regulación endocítica, y por eso la detectamos por toda la MP de la proyección.

Cuando se bloquea la endocitosis durante el proceso de conjugación, el efecto que se observa es bastante interesante, no sólo se produce una acumulación de Chs3p en la punta del *shmoo*, sino también de otras proteínas polarizadas durante la conjugación como son Fus1p y Bud6p. Este acúmulo, viene además acompañado de una deposición de quitina en la punta. Lo que es más sorprendente es que la acumulación de Chs3p depende de Chs4p, ya que en el mutante *chs4Δ* tratado con Latrunculina A durante conjugación no se observa este acúmulo de



Chs3p. Viendo que, tanto la Chs4p completa como la Chs4p Δ 590 se acumulan en la punta tras el mismo tratamiento, podemos presuponer que la acumulación de Chs4p en la punta retiene a Chs3p y esto provocaría la síntesis de quitina en esa región. Sin embargo, también se podría explicar mediante un bloqueo específico de Chs3p, es decir, que al paralizar el proceso de endocitosis, se acumule preferentemente la Chs3p activa, que asumimos presenta una conformación distinta. Puesto que en *chs4* Δ toda la proteína se presenta en un estado inactivo, nunca veríamos esta acumulación de Chs3p. El bloqueo de la endocitosis con Latrunculina A soporta el modelo del Spk, ya que al impedir la endocitosis en la zona subapical y que la secreción polarizada continúa un tiempo en presencia de esta droga, la acumulación se acabaría produciendo en la punta. La causa de que Chs3p no difunda a lo largo de la MP y quede inmovilizada en la punta es una cuestión que aún nos queda por resolver. Desafortunadamente, la cepa *end4* Δ no conjuga apropiadamente por lo que los experimentos a realizar vienen determinados por la disponibilidad de la Latrunculina A.

Un fenotipo bastante similar al del bloqueo de la endocitosis, se observa con la construcción Chs4p- Δ 590. En este caso, al carecer Chs4p del dominio de prenilación y no haber otras proteínas implicadas en su anclaje durante la conjugación, esperaríamos una completa deslocalización de la proteína e incluso ausencia en la síntesis de quitina. Sin

embargo, cuando observamos Chs4p Δ 590-GFP al microscopio de fluorescencia, ésta se localiza débilmente y de forma exclusiva en la punta del *shmoo*. Sorprendentemente, este mutante presenta sólo una reducción moderada en los niveles de quitina respecto al silvestre, que va acompañada por la acumulación de quitina en la punta de muchos de los *shmoos*. Este fenotipo genera también una menor eficiencia de conjugación, aunque no sabemos si es debido a un efecto directo o indirecto de la deslocalización de quitina. Además, la acumulación de Chs4p no prenilado en la punta es dependiente de Chs3p, ya que en su ausencia, Chs4p Δ 590 pierde su localización completamente. Si comparamos estos resultados, parecería que es la interacción Chs3p-Chs4p la que bloquea al complejo QSIII en la punta en ausencia de endocitosis o prenilación. Alternativamente sólo la QSIII activa se bloquea en estas condiciones. En su conjunto, nuestros resultados sugieren que el cambio producido por Chs4p podría alterar el desplazamiento lateral de Chs3p por la MP. La respuesta a esta pregunta podría realizarse en el futuro mediante experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) comparando el desplazamiento lateral de Chs3p en presencia o ausencia de Chs4p.

Una de las curiosidades más atractivas de la conjugación, es que a diferencia de lo que ocurre en vegetativo, la localización de Chs3/4p no colocaliza con la síntesis de quitina. Mientras que estas proteínas se sitúan por toda la MP de la proyección, la síntesis de quitina sólo tiene lugar en la base, coincidente con la localización de septinas. Puesto que la síntesis activa de quitina coincidía con la localización de las septinas en conjugación, y que Bni4p es prescindible durante todo este proceso, nos planteamos la posibilidad de que la unión del complejo Chs3/4p a las septinas fuera determinante en la síntesis de quitina. Sin embargo, la utilización de la cepa *cdc28-13* mostró que la localización de las septinas no determina la deposición de quitina en las células hiperpolarizadas de este mutante. Aunque la extrapolación de este resultado a *shmoos* auténticos hay que tomarlo con precaución, sí que es un indicio de que la localización de las septinas no es tan relevante para la disposición de quitina durante el proceso de conjugación. De esta forma, se pone nuevamente de manifiesto las diferencias entre la etapa vegetativa y de conjugación, ya que durante el crecimiento vegetativo la deposición del anillo de septinas es esencial para la correcta localización del anillo de quitina (Roh et al., 2002a).

Con todos estos datos, el modelo más plausible consistiría en que la fuerte inducción de los niveles de Chs3p en conjugación (Cos et al., 1998), junto con su transporte hiperpolarizado hacia la punta del *shmoo*, provocaría una saturación de la maquinaria endocítica restringida a la zona subapical. Esto desencadena como efecto indirecto, la redistribución de Chs3p por toda la MP de la proyección. Al bloquear el proceso de endocitosis observamos que sólo la Chs3p activa queda retenida en la punta del *shmoo*, a priori esto sugiere, que la conformación activa de Chs3p es más sensible al proceso endocítico mientras que la no activa escapa totalmente a esta regulación negativa, pasando a residir por toda la MP de la prolongación, tal como ocurre en el mutante *chs4 Δ* . Así, todo esto sugiere que una pequeña parte de la proteína Chs3p activa, posiblemente como consecuencia de la

saturación del sistema, escapa también a la internalización, difundiendo hasta la base de la proyección que es donde tiene lugar la síntesis de quitina. Una posibilidad es que la difusión rápida desde la punta hasta la base impida su estabilidad enzimática, por lo que no detectamos síntesis de quitina hasta que alcanza un estado fijo y estable en la base. O también es posible, que la MP de esta región albergue una serie de factores o características que promuevan la actividad QSIII (Ver más adelante). En cualquier caso, desentrañar el mecanismo de regulación de Chs3p en estas condiciones, podría proporcionar un modelo para otras proteínas que se inducen específicamente durante la conjugación.

3.1 Asociación de Chs3p a Lipid Rafts en conjugación

Puesto que Chs3p se mantiene constantemente polarizada en conjugación, independientemente de la localización de las septinas, decidimos analizar que características especiales presentaba la MP de la proyección sexual. Se ha descrito que la MP de la prolongación es rica en ergosterol y presenta una ordenación mayor que el resto de la MP, lo que llevó a la conclusión de que en esa región se concentran los Lipid Rafts (Jin et al., 2008; Proszynski et al., 2006). Estos microdominios de membrana son también los responsables de que algunas proteínas, como Fus1p, se mantengan correctamente localizada en la punta del *shmoo* (Bagnat & Simons, 2002; Proszynski et al., 2006). Por tanto, era posible que Chs3p mantenga el mismo mecanismo de regulación. Ciertamente, cuando determinamos si Chs3p está vinculada a Lipid Rafts durante la conjugación, vemos que un porcentaje significativo de la proteína está asociada a ellos. Algo que no se detecta en vegetativo, usando tanto la cepa silvestre como el mutante *end4Δ*. La cantidad de Chs3p que está asociada a Lipid Rafts en conjugación es limitada, pero si tenemos en cuenta que durante esta etapa Chs3p se puede acumular en la MP tanto en estado activo como inactivo, es posible que sólo la forma activa es la que esté presente en estos microdominios de membrana. De hecho, el tratamiento con Tritón x-100 parece provocar que la proteína asociada a los Lipid Rafts sea más sensible a la degradación por proteasa que la no asociada, por lo que podríamos especular que la Chs3p asociada a los Lipid Rafts presenta una conformación distinta a la que no. Por todo ello, no sería descabellado pensar que esta asociación con Lipid Rafts este relacionada con la conformación activa de la proteína, y podría incluso intervenir de alguna forma en su *turnover* endocítico. Desafortunadamente, resultados recientes no apoyan esta hipótesis, ya que Chs3p permanece asociada a los Lipid Rafts incluso en ausencia de Chs4p, donde sabemos que toda la QSIII se presenta en un estado inactivo.

En conjugación, la cepa *erg6Δ* presenta un defecto en la síntesis de ergosterol (Lees et al., 1995), y por tanto en la correcta biosíntesis de los Lipid Rafts (Bagnat et al., 2000; Bagnat & Simons, 2002). Este mutante, tiene alterada la asociación de Fus1p con los Lipid Rafts y esto parece ser la causa de la deslocalización de esta proteína (Bagnat & Simons, 2002). La cepa *erg6Δ* presenta un defecto en la localización de quitina exclusivamente durante la fase sexual, que es justamente donde detectamos Chs3p asociada a Lipid Rafts. Esto apoya una

posible relación funcional entre Chs3p y las balsas lipídicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que Erg6p participa en el proceso de respuesta a feromonas (Jin et al., 2008), y es posible que la deslocalización de quitina sea un efecto totalmente indirecto como consecuencia de un alteración en la cascada de transducción de la señal.

La asociación de Chs3p a los Lipid Rafts puede ser también una consecuencia de la alta cantidad de la QSIII polarizada hacia la proyección, una región rica en estos microdominios de membrana, y que por saturación del sistema, acabe incorporándose a los Lipid Rafts. A favor de esta hipótesis tenemos los datos del mutante *end4Δ*, puesto que en este caso hay una gran cantidad de Chs3p que permanece activa en la MP y no detectamos asociación a Lipid Rafts. Sin embargo, no sabemos con certeza que la distribución de los Lipid Rafts no se vea alterado en este mutante, ya que acumula una gran cantidad de defectos fenotípicos.

Los estudios centrados en el transporte y regulación de proteínas de membrana durante la fase de conjugación son muy limitados. Hasta la fecha se han planteado dos posibles mecanismos no excluyentes: el de la proteína Snc1p, que se mantiene localizada gracias a la baja difusión lateral junto con la recuperación endocítica (Valdez-Taubas & Pelham, 2003) y el de Fus1p, cuya localización polarizada depende de la correcta asociación los Lipid Rafts (Bagnat & Simons, 2002; Proszynski et al., 2006). El problema que presentan ambas proteínas al tomarlas como modelo comparativo de Chs3p, es que la QSIII presenta una regulación, a priori distinta en las distintas fases del ciclo. Sin embargo, Snc1p presenta la misma localización y regulación que en vegetativo y Fus1p ni siquiera se expresa fuera de la fase sexual. A día de hoy, desconocemos cual es el posible mecanismo de regulación que presenta Chs3p en conjugación. Es posible que sea una cooperación entre los dos mecanismos descritos o que sea uno completamente diferente y no descrito hasta la fecha. Lo cual podría suponer una nueva pauta de comportamiento en la polarización y distribución de proteínas de membrana.

4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE Chs3p

Según el modelo planteado a lo largo de este trabajo, Chs4p transloca a Chs3p en la MP, induciéndole un estado conformacional que sería además estable en la MP. Ya que es muy probable que Chs4p modifique postraduccionalmente a Chs3p, decidimos purificar y analizar Chs3p mediante espectrometría de masas con el fin de determinar las modificaciones covalentes que sufre esta proteína. Chs3p, al ser una proteína integral de membrana, dificulta mucho su purificación y secuenciación, por lo que la cantidad de péptidos secuenciados apenas alcanzaba el 36% de la proteína total. Además, teniendo en cuenta que en una cepa silvestre la cantidad de Chs3p en MP y potencialmente modificada es inferior al 10%, la cantidad de modificaciones postraduccionales que podemos detectar está realmente limitada. Aún así, el conjunto de datos, tanto nuestros como de la base de datos del EXPASY, revelaron que Chs3p presenta, al menos, dos tipos de modificaciones: fosforilación y ubiquitinación, que se unirían

al ya descrito de palmitoilación (Lam et al., 2006).

Al mutar la mayoría de los sitios de fosforilación no observamos ningún defecto ni en la síntesis ni en la distribución de quitina en condiciones normales de crecimiento. Sin embargo, es posible que estas fosforilaciones sí tengan un papel activador sólo en condiciones de estrés, ya que se ha descrito que en estas condiciones la cantidad de quitina aumenta considerablemente. De hecho, una de las fosforilaciones publicadas se detectó tras la activación de una quinasa por daño en DNA (Smolka et al., 2007). Esto podría indicar que efectivamente la activación de la ruta PKC, para el caso concreto de Chs3p, podría ser la responsable de estas fosforilaciones que regularían la activación de la enzima. En el caso del mutante de ubiquitinación (Chs3p^{K136R}) detectamos un leve incremento en la síntesis de quitina. También se detecta un ligero aumento de su estabilidad en membrana al marcarla con la GFP. Esto nos indica que posiblemente la ubiquitinación sea el mecanismo de señalización para la endocitosis de Chs3p. Por tanto, este mutante modificado en la lisina ubiquitinada sería endocitado con menor eficiencia y a la postre, más estable en MP. Que este incremento de quitina no sea muy notable se puede explicar porque, o bien existan otras lisinas ubiquitinadas, o bien exista una limitación tanto de sustrato como de anclaje al septo, pues se debe recordar que con la sobreexpresión de Chs4p el incremento en quitina es inferior al 7%.

Cuando ponemos en conjunto los datos de las modificaciones postraduccionales de Chs3p, datos del análisis masivo de la topología de proteínas de membrana (Kim et al., 2006), el modelo predictivo de la estructura de Chs3p, la región que interacciona con Chs4p y la localización del dominio catalítico, obtenemos un modelo con 6 dominios transmembrana con los dos extremos de la proteína hacia el interior celular. La región central globular, que es donde se localiza el dominio catalítico de la enzima y donde interacciona con Chs4p, quedaría orientada hacia el citoplasma. Es posible, que Chs4p modifique conformacionalmente el estado de Chs3p en esa región globular, con lo que se podría estar afectando al dominio catalítico de la enzima, tal como indican los datos de los parámetros cinéticos de la QSIII en un *end4Δ chs4Δ*. Este dominio es significativamente más pequeño en las QS de clase V que son totalmente independientes de Chs4p, lo que indirectamente apoyaría nuestra hipótesis.

Otro dato interesante, es la interacción entre distintas moléculas de Chs3p, lo que nos indicaría que esta proteína podría estar actuando en forma de complejos. Es incluso posible, que la agregación de varias moléculas sea determinante para la actividad enzimática. El análisis bioquímico usando DSP, un compuesto que estabiliza las uniones de forma irreversible, mostró que las moléculas de Chs3p se agregan en el mutante *end4Δ*, mientras que no esto no ocurre en una cepa silvestre (Kota & Ljungdahl, 2005; Lam et al., 2006). Por tanto, es bastante posible que la Chs3p activa, que es la retenida en la MP, esté formando complejos. Se ha descrito que en el caso de la celulosa sintasa, que presenta homología estructural con la quitina sintasa, varias subunidades catalíticas forman poros que se asocian en rosetas, a través de los cuales se va exportando la cadena naciente de celulosa (Doblin et al., 2002). Por tanto, podríamos estar ante el mismo mecanismo molecular de síntesis. Una posibilidad muy

atractiva sería que Chs4p estuviera regulando esta agregación, y por consiguiente, la activación de la QSIII.

Puesto que el extremo hidrofílico N-terminal de Chs3p era el responsable de la interacción entre varias moléculas de Chs3p, al mismo tiempo que presentaba una gran cantidad de modificaciones postraduccionales, decidimos ir eliminando fragmentos crecientes desde el comienzo de la proteína. Las proteínas delecionadas quedaban retenidas en el RE, especialmente las $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 194$ -Chs3p. Probablemente, la truncación del extremo N-terminal de Chs3p afecte a su interacción con Chs7p o esta región sea el sustrato de palmitoilación, sea como fuere, en ambos casos su salida del RE estaría mermada. La sobreexpresión de *CHS7* mejoraba este fenotipo, reduciéndose la cantidad de Chs3p retenida en el RE y pasando, en el caso de la $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p a localizarse en la zona del septo y ligeramente por toda la MP aunque reduciéndose en los puntos intracelulares típicos de una cepa silvestre. De las tres proteínas truncadas, únicamente la $\Delta 194$ -Chs3p resultó ser completamente no funcional, no detectándose ni síntesis de quitina ni localización en membrana, con y sin sobreexpresión de *CHS7*. Posiblemente, la estabilidad del primer dominio transmembrana esté afectada y el plegamiento de esta proteína sea defectuoso. La $\Delta 63$ -Chs3p y $\Delta 126$ -Chs3p a pesar de su dificultad para ser exportadas del RE, presentan unos niveles de quitina silvestres sin sobreexpresar *CHS7*. Sin embargo, esta quitina se presenta parcialmente deslocalizada por las paredes laterales, lo que explicaría, al igual que ocurre con el mutante *bni4Δ*, los altos niveles de resistencia a calcoflúor que presentan estas dos cepas. Curiosamente, una de las primeras clonaciones de Chs3p, carecía de los 60 primeros aminoácidos y se describió que no afectaba ni a su actividad ni a su regulación (Choi et al., 1994a). Puesto que la distribución de quitina no es un defecto demasiado aparente y se produce la activación de la QSIII, el resto de fenotipos pasaron desapercibidos en ese momento.

¿Por qué la deleción del extremo N-terminal provoca una deslocalización de la síntesis de quitina? Todo indica que estas proteínas presentan una mayor estabilidad en la MP en un estado activo. Una posible explicación es que el extremo N-terminal de Chs3p contenga otros potenciales sitios de ubiquitinación, por lo que la regulación endocítica de estas proteínas estaría reducida favoreciendo la difusión lateral de la proteína. Además, y aunque en principio la deleción del extremo N-terminal no afectaría a su interacción con Chs4p y por tanto a su anclaje al septo, es también posible que dicho anclaje se vea alterado y Chs3p no se mantenga correctamente localizada. De hecho, la tinción con calcoflúor demuestra una malformación en la síntesis del anillo de quitina en ausencia del extremo N-terminal, a pesar de los niveles silvestre del polímero. Asimismo, existe la posibilidad de que al no interactuar adecuadamente las distintas moléculas de Chs3p, la conformación que adquiere en la MP hace que el *turnover* de la proteína sea ineficiente. Un caso bastante similar ocurre con la proteína Gap1p, una aminoácido-permeasa de MP. Se ha descrito, que en su extremo C-terminal contiene señales para la ubiquitinación, salida de RE y llegada a MP a través de su interacción con otras proteínas (Gao & Kaiser, 2006).

Sorprendentemente, estas cepas presentan una notable resistencia a calcoflúor, pese a tener unos niveles de quitina silvestres. Probablemente, la localización de quitina en el septo sea determinante para la acción antifúngica del calcoflúor, ya que se ha descrito que la lisis comienza en esa región, que es precisamente donde se acumula el 90% de la quitina celular (Roncero & Duran, 1985; Roncero et al., 1988b). El modelo propuesto para la actuación del calcoflúor es que se va intercalando entre las cadenas nacientes de quitina de tal forma que impide la cristalización de la α -quitina. De esta manera se produciría un desacoplamiento entre el proceso de polimerización y cristalización, que parece ser el responsable de un aumento en la tasa de síntesis de la quitina. Este modelo lleva implícito la agregación de la QSIII en forma de poros o rosetas. Por tanto, una posible explicación es que al verse alterada la capacidad de interacción entre distintas moléculas de Chs3p, los poros no se estén formando adecuadamente y por tanto, la tasa de síntesis no esté siendo autorregulada negativamente por el grado de cristalización de la quitina. En estas condiciones el efecto del calcoflúor se vería minimizado y de ahí la resistencia de estas cepas, muy superior a la del mutante *bni4* Δ . Además, puede suponerse que al delecionar el extremo N-terminal de Chs3p se estuviera mimetizando el efecto del calcoflúor *in vivo*, consiguiendo una elevada tasa de síntesis aunque la cantidad de Chs3p que alcance la MP aparentemente sea más baja. Una forma de demostrar esta hipótesis, sería determinando que la cantidad de quitina insoluble, y por tanto cristalizada, sea inferior en los mutantes delecionados en el extremo N-terminal de Chs3p. Este modelo explicaría también la resistencia al calcoflúor, al disminuir la interacción de éste con la quitina.

A lo largo del presente trabajo se ha puesto de manifiesto que Chs3p es una proteína con una regulación postraduccional compleja, no sólo por la cantidad de proteínas que intervienen en su transporte y activación, sino también por el delicado equilibrio que la mantiene correctamente polarizada. Durante el proceso vegetativo, esta proteína presenta una estrecha relación entre su localización y su estado de activación, sin embargo, en otras etapas del ciclo de la levadura, esta relación se ve alterada. A pesar de haber analizado una gran cantidad de factores y posibles causas, no hemos encontrado el elemento clave que determina una regulación tan específica en cada fase del ciclo. El distinto comportamiento que presenta Chs3p en vegetativo respecto a conjugación, o su respuesta tan dispar ante el bloqueo de endocitosis en ambos procesos, sugieren una posible regulación específica para cada etapa. Los datos de los que disponemos actualmente apuntan hacia una regulación del *turnover* de la proteína, que va variando según la fase del ciclo. Sin embargo, no se puede descartar la existencia de otros factores que actúen particularmente en cada etapa activando la QSIII de forma específica.

El análisis de la topología de Chs3p y de las modificaciones postraduccionales, han confirmado, que incluso a nivel molecular, esta proteína presenta una estructura compleja que afecta, a su vez, a su propia regulación y *turnover* endocítico. Desentrañar el mecanismo de regulación tanto específico de cada etapa, como el posible elemento común a todas ellas, podría establecer un nuevo modelo de regulación de proteínas integrales de membrana, extrapolable a otras proteínas de MP, como Gap1p o Pma1p, que comparten ciertos elementos

estructurales con Chs3p. El modelo que emerge del trabajo con estas proteínas, es que proteínas complejas con múltiples dominios transmembrana, requieren mecanismos específicos para su correcto plegamiento. Este modelo puede ser extrapolado a células animales y no sería sorprendente encontrar en el futuro algunas enfermedades que son consecuencia de la alteración de estos procesos.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

1. Chs4p posee sus propias señales para llegar a la MP y no depende del resto de proteínas Chsp. Tanto Chs3p como Chs4p son proteínas asociadas a membrana que se transportan en vesículas polarizadas de forma independiente.
2. El extremo C-terminal de Chs4p, que contiene el dominio de prenilación, determina su localización a lo largo de la MP. Sin embargo, en su ausencia, Chs4p permanece anclada al cuello gracias a su interacción directa con Bni4p y Chs3p.
3. Chs4p induce la activación de la QSIII mediante la translocación de Chs3p en la MP en una forma activa y estable. Chs3p se mantiene correctamente polarizada gracias a un equilibrio dinámico entre su transporte anterógrado hacia la zona del septo y su *turnover* endocítico en esa región, el cual es dependiente de Chs4p.
4. El extremo N-terminal de Chs3p media la interacción entre distintas moléculas de dicha proteína y al mismo tiempo es sustrato de diversas modificaciones postraduccionales potencialmente implicadas en la regulación de la actividad QSIII.
5. Durante la conjugación, la maquinaria de síntesis de quitina es independiente del ensamblaje de septinas. Asimismo, la localización de Chs3p es mayoritariamente independiente del *turnover* endocítico, lo que explicaría su acumulación en la MP en ausencia de Chs4p. Por tanto, en este caso, Chs4p es responsable únicamente de la activación de la QSIII.

BIBLIOGRAFÍA



- Adamo, J. E., Moskow, J. J., Gladfelter, A. S., Viterbo, D., Lew, D. J. and Brennwald, P. J.** (2001). Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J Cell Biol* **155**, 581-92.
- Alvarez, F. J., Douglas, L. M. and Konopka, J. B.** (2007). Sterol-rich plasma membrane domains in fungi. *Eukaryot Cell* **6**, 755-63.
- Amberg, D. C.** (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol Biol Cell* **9**, 3259-62.
- Appeltauer, U. and Achstetter, T.** (1989). Hormone-induced expression of the *CHS1* gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **181**, 243-7.
- Arvan, P., Zhao, X., Ramos-Castaneda, J. and Chang, A.** (2002). Secretory pathway quality control operating in Golgi, plasmalemmal, and endosomal systems. *Traffic* **3**, 771-80.
- Bagnat, M., Chang, A. and Simons, K.** (2001). Plasma membrane proton ATPase Pma1p requires raft association for surface delivery in yeast. *Mol Biol Cell* **12**, 4129-38.
- Bagnat, M., Keranen, S., Shevchenko, A., Shevchenko, A. and Simons, K.** (2000). Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3254-9.
- Bagnat, M. and Simons, K.** (2002). Cell surface polarization during yeast mating. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14183-8.
- Bahler, J. and Pringle, J. R.** (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* **12**, 1356-70.
- Bardwell, L.** (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**, 339-50.
- Barlowe, C.** (2003). Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol* **13**, 295-300.
- Bartnicki-Garcia, S.** (1968). Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* **22**, 87-108.
- Bowers, K. and Stevens, T. H.** (2005). Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1744**, 438-54.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* **72**, 248-254.
- Brennwald, P. and Rossi, G.** (2007). Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett* **581**, 2119-24.
- Briza, P., Ellinger, A., Winkler, G. and Breitenbach, M.** (1990). Characterization of a DL-dityrosine-containing macromolecule from yeast ascospore walls. *J Biol Chem* **265**, 15118-23.
- Bulawa, C. E.** (1992). *CSD2*, *CSD3*, and *CSD4*, genes required for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the *CSD2* gene product is related to chitin synthases and to developmentally regulated proteins in *Rhizobium* species and *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* **12**, 1764-76.
- Bulawa, C. E.** (1993). Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* **47**, 505-34.
- Bulawa, C. E. and Osmond, B. C.** (1990). Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**, 7424-8.
- Bulawa, C. E., Slater, M., Cabib, E., Au-Young, J., Sburlati, A., Adair, W. L. J. and Robbins, P. W.** (1986). The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46**, 213-25.
- Cabib, E., Blanco, N., Grau, C., Rodriguez-Pena, J. M. and Arroyo, J.** (2007). Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**, 921-35.

- Cabib, E. and Duran, A.** (2005). Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem* **280**, 9170-9.
- Cabib, E., Farkas, V., Kosik, O., Blanco, N., Arroyo, J. and McPhie, P.** (2008). Assembly of the Yeast Cell Wall: Crh1p AND Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* **283**, 29859-72.
- Cabib, E., Roberts, R. and Bowers, B.** (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Annu Rev Biochem* **51**, 763-93.
- Cabib, E., Roh, D. H., Schmidt, M., Crotti, L. B. and Varma, A.** (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* **276**, 19679-82.
- Cabib, E., Sburlati, A., Bowers, B. and Silverman, S. J.** (1989). Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **108**, 1665-72.
- Cabib, E. and Schmidt, M.** (2003). Chitin synthase III activity, but not the chitin ring, is required for remedial septa formation in budding yeast. *FEMS Microbiol Lett* **224**, 299-305.
- Cabib, E., Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B. and Choi, W. J.** (1996). Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology*, (eds R. Brambl and G. A. Marzluf), pp. 243-267. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cabib, E., Silverman, S. J. and Shaw, J. A.** (1992). Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **138**, 97-102.
- Carotti, C., Ferrario, L., Roncero, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Popolo, L.** (2002). Maintenance of cell integrity in the *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae* requires the Chs3p-targeting and activation pathway and involves an unusual Chs3p localization. *Yeast* **19**, 1113-24.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. and Sanchez, M.** (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**, 345-86.
- Colman-Lerner, A., Chin, T. E. and Brent, R.** (2001). Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**, 739-50.
- Cos, T., Ford, R. A., Trilla, J. A., Duran, A., Cabib, E. and Roncero, C.** (1998). Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**, 419-26.
- Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. and Emr, S. D.** (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-18.
- Chen, L. and Davis, N. G.** (2000). Recycling of the yeast a-factor receptor. *J Cell Biol* **151**, 731-8.
- Choi, W. J. and Cabib, E.** (1994). The use of divalent cations and pH for the determination of specific yeast chitin synthetases. *Anal Biochem* **219**, 368-72.
- Choi, W. J., Santos, B., Duran, A. and Cabib, E.** (1994a). Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol Cell Biol* **14**, 7685-94.
- Choi, W. J., Sburlati, A. and Cabib, E.** (1994b). Chitin synthase 3 from yeast has zymogenic properties that depend on both the *CAL1* and the *CAL3* genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4727-30.
- Christianson, T. W., Sikorski, R. S., Dante, M., Shero, J. H. and Hieter, P.** (1992). Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **110**, 119-22.
- Chuang, J. S. and Schekman, R. W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**, 597-610.
- De Groot, P. W., Ram, A. F. and Klis, F. M.** (2005). Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**, 657-75.
- Delley, P. A. and Hall, M. N.** (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**, 163-74.

- DeMarini, D. J., Adams, A. E., Fares, H., De Virgilio, C., Valle, G., Chuang, J. S. and Pringle, J. R.** (1997). A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139**, 75-93.
- Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D. and Delmer, D. P.** (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant Cell Physiol* **43**, 1407-20.
- Drgonova, J., Drgon, T., Roh, D. H. and Cabib, E.** (1999). The GTP-binding protein Rho1p is required for cell cycle progression and polarization of the yeast cell. *J Cell Biol* **146**, 373-87.
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y. and Cabib, E.** (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* **272**, 277-9.
- Dupre, S., Urban-Grimal, D. and Haguenaer-Tsapis, R.** (2004). Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta* **1695**, 89-111.
- Ellgaard, L. and Helenius, A.** (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.
- Engqvist-Goldstein, A. E. and Drubin, D. G.** (2003). Actin assembly and endocytosis: from yeast to mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 287-332.
- Finger, F. P. and Novick, P.** (1998). Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J Cell Biol* **142**, 609-12.
- Ford, R. A., Shaw, J. A. and Cabib, E.** (1996). Yeast chitin synthases 1 and 2 consist of a non-homologous and dispensable N-terminal region and a homologous moiety essential for function. *Mol Gen Genet* **252**, 420-428.
- Ford, S. K. and Pringle, J. R.** (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the *CDC11* gene product and the timing of events at the budding site. *Dev Genet* **12**, 281-92.
- Gao, M. and Kaiser, C. A.** (2006). A conserved GTPase-containing complex is required for intracellular sorting of the general amino-acid permease in yeast. *Nat Cell Biol* **8**, 657-67.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Roncero, C.** (2000). Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **478**, 84-8.
- Ghaemmaghmi, S., Huh, W. K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., O'Shea, E. K. and Weissman, J. S.** (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* **425**, 737-41.
- Girao, H., Geli, M. I. and Idrissi, F. Z.** (2008). Actin in the endocytic pathway: from yeast to mammals. *FEBS Lett* **582**, 2112-9.
- Gong, X. and Chang, A.** (2001). A mutant plasma membrane ATPase, Pma1-10, is defective in stability at the yeast cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9104-9.
- Grabinska, K. A., Magnelli, P. and Robbins, P. W.** (2007). Prenylation of *Saccharomyces cerevisiae* Chs4p Affects Chitin Synthase III activity and chitin chain length. *Eukaryot Cell* **6**, 328-36.
- Graham, T. R. and Emr, S. D.** (1991). Compartmental organization of Golgi-specific protein modification and vacuolar protein sorting events defined in a yeast sec18 (NSF) mutant. *J Cell Biol* **114**, 207-18.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. and Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-16.
- Harsay, E. and Bretscher, A.** (1995). Parallel secretory pathways to the cell surface in yeast. *J Cell Biol* **131**, 297-310.
- Harsay, E. and Schekman, R.** (2002). A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol* **156**, 271-85.
- Hasek, J., Rupes, I., Svobodova, J. and Streiblova, E.** (1987). Tubulin and actin topology during zygote formation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **133**, 3355-63.

- Holthuis, J. C., Nichols, B. J. and Pelham, H. R.** (1998). The syntaxin Tlg1p mediates trafficking of chitin synthase III to polarized growth sites in yeast. *Mol Biol Cell* **9**, 3383-97.
- Horak, J.** (2003). The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim Biophys Acta* **1614**, 139-55.
- Idrissi, F. Z., Grotsch, H., Fernandez-Golbano, I. M., Presciatto-Baschong, C., Riezman, H. and Geli, M. I.** (2008). Distinct acto/myosin-I structures associate with endocytic profiles at the plasma membrane. *J Cell Biol* **180**, 1219-32.
- Igual, J. C., Johnson, A. L. and Johnston, L. H.** (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor *SWI4* and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* **15**, 5001-5013.
- Ishihara, S., Hirata, A., Nogami, S., Beauvais, A., Latge, J. P. and Ohya, Y.** (2007). Homologous subunits of 1,3-beta-glucan synthase are important for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **6**, 143-56.
- Jin, H., McCaffery, J. M. and Grote, E.** (2008). Ergosterol promotes pheromone signaling and plasma membrane fusion in mating yeast. *J Cell Biol* **180**, 813-26.
- Kaiser, C. A., Gimeno, R. E. and Shaywitz, D. A.** (1997). Protein secretion, membrane biogenesis, and endocytosis. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Volume 3: Cell Cycle and Cell Biology, vol. 3 (eds J. R. Pringle J. R. Broach and E. W. Jones), pp. 229-362. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Kaksonen, M., Sun, Y. and Drubin, D. G.** (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* **115**, 475-87.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. and Klis, F. M.** (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**, 337-45.
- Kawamoto, S., Nomura, N. and Ohno, T.** (1992). Cloning and characterization of *SKT5*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects protoplast regeneration and resistance to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *J Ferment Bioeng* **74**, 199-108.
- Kim, H., Melen, K., Osterberg, M. and von Heijne, G.** (2006). A global topology map of the *Saccharomyces cerevisiae* membrane proteome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11142-7.
- Kim, H. B., Haarer, B. K. and Pringle, J. R.** (1991). Cellular morphogenesis in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: localization of the *CDC3* gene product and the timing of events at the budding site. *J Cell Biol* **112**, 535-44.
- Klis, F. M., Boorsma, A. and De Groot, P. W.** (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K. and Brul, S.** (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**, 239-56.
- Kollar, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Cabib, E.** (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta (1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta (1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**, 17762-75.
- Konopka, J. B., Jenness, D. D. and Hartwell, L. H.** (1988). The C-terminus of the *S. cerevisiae* alpha-pheromone receptor mediates an adaptive response to pheromone. *Cell* **54**, 609-20.
- Kota, J. and Ljungdahl, P. O.** (2005). Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol* **168**, 79-88.
- Kozubowski, L., Panek, H., Rosenthal, A., Bloecher, A., DeMarini, D. J. and Tatchell, K.** (2003). A Bni4-Glc7 phosphatase complex that recruits chitin synthase to the site of bud emergence. *Mol Biol Cell* **14**, 26-39.
- Krainer, E., Stark, R. E., Naider, F., Alagramam, K. and Becker, J. M.** (1994).

Direct observation of cell wall glucans in whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* by magic-angle spinning ^{13}C -NMR. *Biopolymers* **34**, 1627-35.

Kron, S. J. and Gow, N. A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 845-55.

Krsmanovic, T., Pawelec, A., Sydor, T. and Kolling, R. (2005). Control of Ste6 recycling by ubiquitination in the early endocytic pathway in yeast. *Mol Biol Cell* **16**, 2809-21.

Kunkel, T. A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 488-492.

Kuranda, M. J. and Robbins, P. W. (1991). Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**, 19758-67.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lagorce, A., Le Berre-Anton, V., Aguilar-Uscanga, B., Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A. and Francois, J. (2002). Involvement of *GFA1*, which encodes glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase, in the activation of the chitin synthesis pathway in response to cell-wall defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **269**, 1697-1707.

Lam, K. K., Davey, M., Sun, B., Roth, A. F., Davis, N. G. and Conibear, E. (2006). Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3. *J Cell Biol* **174**, 19-25.

Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R. and Bard, M. (1995). Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Lipids* **30**, 221-6.

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 317-43.

Lesage, G., Shapiro, J., Specht, C. A., Sdicu, A. M., Menard, P., Hussein, S., Tong, A. H., Boone, C. and Bussey, H. (2005). An

interactional network of genes involved in chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet* **6**, 8.

Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 262-91.

Lew, D. J. and Reed, S. I. (1995). Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr Opin Genet Dev* **5**, 17-23.

Lewis, M. J., Nichols, B. J., Prescianotto-Baschong, C., Riezman, H. and Pelham, H. R. (2000). Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell* **11**, 23-38.

Lipke, P. N. and Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**, 3735-40.

Liu, Y. and Chang, A. (2006). Quality control of a mutant plasma membrane ATPase: ubiquitylation prevents cell-surface stability. *J Cell Sci* **119**, 360-9.

Liu, Y., Sitaraman, S. and Chang, A. (2006). Multiple degradation pathways for misfolded mutants of the yeast plasma membrane ATPase, Pma1. *J Biol Chem* **281**, 31457-66.

Marks, J. and Hyams, J. S. (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* **39**, 27-32.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. and Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**, 5671-81.

Mittl, P. R. and Schneider-Brachert, W. (2007). Sell1-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal* **19**, 20-31.

Molano, J., Bowers, B. and Cabib, E. (1980). Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study. *J Cell Biol* **85**, 199-212.

Muhlrad, D., Hunter, R. and Parker, R. (1992). A rapid method for localized mutagenesis of yeast genes. *Yeast* **8**, 79-82.

- Nagahashi, S., Sudoh, M., Ono, N., Sawada, R., Yamaguchi, E., Uchida, Y., Mio, T., Takagi, M., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (1995). Characterization of Chitin synthase 2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**, 13961-13967.
- Neiman, A. M. (2005). Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 565-84.
- Novick, P. and Botstein, D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* **40**, 405-16.
- Ono, N., Yabe, T., Sudoh, M., Nakajima, T., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (2000). The yeast Chs4 protein stimulates the trypsin-sensitive activity of chitin synthase 3 through an apparent protein-protein interaction. *Microbiology* **146** (Pt 2), 385-91.
- Orlean, P. (1997). Biogenesis of yeast wall and surface components. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces. Volume 3: Cell Cycle and Cell Biology*, vol. 3 (eds J. R. Pringle J. R. Broach and E. W. Jones), pp. 229-362. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Ortiz, D. and Novick, P. J. (2006). Ypt32p regulates the translocation of Chs3p from an internal pool to the plasma membrane. *Eur J Cell Biol* **85**, 107-16.
- Pammer, M., Briza, P., Ellinger, A., Schuster, T., Stucka, R., Feldmann, H. and Breitenbach, M. (1992). *DIT101* (*CSD2*, *CAL1*), a cell cycle-regulated yeast gene required for synthesis of chitin in cell walls and chitosan in spore walls. *Yeast* **8**, 1089-99.
- Pelham, H. R. (2002). Insights from yeast endosomes. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 454-62.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J. E., Thoreen, C. C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D. and Gygi, S. P. (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* **21**, 921-6.
- Pizzirusso, M. and Chang, A. (2004). Ubiquitin-mediated targeting of a mutant plasma membrane ATPase, Pma1-7, to the endosomal/vacuolar system in yeast. *Mol Biol Cell* **15**, 2401-9.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P. and Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1* delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**, 463-469.
- Popolo, L., Gualtieri, T. and Ragni, E. (2001). The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39** (Supplement 1), 111-121.
- Popolo, L. and Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* **1426**, 385-400.
- Preuss, D., Mulholland, J., Franzusoff, A., Segev, N. and Botstein, D. (1992). Characterization of the *Saccharomyces* Golgi complex through the cell cycle by immunoelectron microscopy. *Mol Biol Cell* **3**, 789-803.
- Proszynski, T. J., Klemm, R., Bagnat, M., Gaus, K. and Simons, K. (2006). Plasma membrane polarization during mating in yeast cells. *J Cell Biol* **173**, 861-6.
- Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* **113** (Pt 4), 571-85.
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitskreutz, A., Sopko, R. et al. (2005). Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**, 679-84.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**, 279-81.
- Raths, S., Rohrer, J., Crausaz, F. and Riezman, H. (1993). end3 and end4: two mutants defective in receptor-mediated and fluid-phase endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **120**, 55-65.
- Reissig, J. L., Storminger, J. L. and Leloir, L. F. (1955). A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J Biol Chem* **217**, 959-66.
- Riezman, H. (1985). Endocytosis in yeast: several of the yeast secretory mutants are defective in endocytosis. *Cell* **40**, 1001-9.

- Roh, D. H., Bowers, B., Riezman, H. and Cabib, E.** (2002b). Rho1p mutations specific for regulation of beta(1->3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol Microbiol* **44**, 1167-83.
- Roh, D. H., Bowers, B., Schmidt, M. and Cabib, E.** (2002a). The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast. *Mol Biol Cell* **13**, 2747-59.
- Roncero, C.** (2002). The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Curr Genet* **41**, 367-78.
- Roncero, C. and Duran, A.** (1985). Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**, 1180-5.
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C. and Duran, A.** (1988a). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *J Bacteriol* **170**, 1950-4.
- Roncero, C., Valdivieso, M. H., Ribas, J. C. and Duran, A.** (1988b). Effect of calcofluor white on chitin synthases from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **170**, 1945-9.
- Rose, J. K. and Doms, R. W.** (1988). Regulation of protein export from the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Cell Biol* **4**, 257-88.
- Roumanie, O., Wu, H., Molk, J. N., Rossi, G., Bloom, K. and Brennwald, P.** (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol* **170**, 583-94.
- Ruiz-Herrera, J., Gonzalez-Prieto, J. M. and Ruiz-Medrano, R.** (2002). Evolution and phylogenetic relationships of chitin synthases from yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* **1**, 247-56.
- Ruiz-Herrera, J. and Xoconostle-Cazares, B.** (1995). Molecular and genetic control of chitin biosynthesis in fungi. *Arch Med Res* **26**, 315-21.
- Sambrook, J. and Russell, D. W.** (2001). "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Manniatis, T.** (1989). Molecular Cloning: A laboratory manual, (eds J. Sambrook and T. Manniatis). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanchatjate, S. and Schekman, R.** (2006). Chs5/6 complex: a multiprotein complex that interacts with and conveys chitin synthase III from the trans-Golgi network to the cell surface. *Mol Biol Cell* **17**, 4157-66.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santos, B., Duran, A. and Valdivieso, M. H.** (1997). *CHS5*, a gene involved in chitin synthesis and mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**, 2485-96.
- Santos, B. and Snyder, M.** (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**, 95-110.
- Sanz, M., Castrejon, F., Duran, A. and Roncero, C.** (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Bni4p directs the formation of the chitin ring and also participates in the correct assembly of the septum structure. *Microbiology* **150**, 3229-41.
- Sanz, M., Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C.** (2002). Control of chitin synthesis through Shc1p, a functional homologue of Chs4p specifically induced during sporulation. *Mol Microbiol* **43**, 1183-95.
- Sato, K. and Nakano, A.** (2007). Mechanisms of COPII vesicle formation and protein sorting. *FEBS Lett* **581**, 2076-82.
- Sburlati, A. and Cabib, E.** (1986). Chitin synthetase 2, a presumptive participant in septum formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **261**, 15147-52.
- Scott, P. M., Bilodeau, P. S., Zhdankina, O., Winistorfer, S. C., Hauglund, M. J., Allaman, M. M., Kearney, W. R., Robertson, A. D., Boman, A. L. and Piper, R. C.** (2004). GGA proteins bind ubiquitin to facilitate sorting at the trans-Golgi network. *Nat Cell Biol* **6**, 252-9.

- Schekman, R. and Brawley, V.** (1979). Localized deposition of chitin on the yeast cell surface in response to mating pheromone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 645-649.
- Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D. H. and Cabib, E.** (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J Cell Sci* **115**, 293-302.
- Schmidt, M., Varma, A., Drgon, T., Bowers, B. and Cabib, E.** (2003). Septins, under Cla4p regulation, and the chitin ring are required for neck integrity in budding yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 2128-41.
- Schorr, M., Then, A., Tahirovic, S., Hug, N. and Mayinger, P.** (2001). The phosphoinositide phosphatase Sac1p controls trafficking of the yeast Chs3p chitin synthase. *Curr Biol* **11**, 1421-6.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R.** (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* **319**, 689-93.
- Shahinian, S. and Bussey, H.** (2000). beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**, 477-89.
- Shaw, J. A., Mol, P. C., Bowers, B., Silverman, S. J., Valdivieso, M. H., Duran, A. and Cabib, E.** (1991). The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114**, 111-23.
- 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.
- Silverman, S. J.** (1989). Similar and different domains of chitin synthases 1 and 2 of *S. cerevisiae*: two isozymes with distinct functions. *Yeast* **5**, 459-67.
- Silverman, S. J., Sburlati, A., Slater, M. L. and Cabib, E.** (1988). Chitin synthase 2 is essential for septum formation and cell division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 4735-9.
- Smits, G. J., van den Ende, H. and Klis, F. M.** (2001). Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**, 781-784.
- Smolka, M. B., Albuquerque, C. P., Chen, S. H. and Zhou, H.** (2007). Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10364-9.
- Souza, C. M. and Pichler, H.** (2007). Lipid requirements for endocytosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 442-54.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A. T.** (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* **395**, 347-53.
- Tagwerker, C., Flick, K., Cui, M., Guerrero, C., Dou, Y., Auer, B., Baldi, P., Huang, L. and Kaiser, P.** (2006). A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivo cross-linking. *Mol Cell Proteomics* **5**, 737-48.
- Taheri-Talesh, N., Horio, T., Araujo-Bazan, L., Dou, X., Espeso, E. A., Penalva, M. A., Osmani, S. A. and Oakley, B. R.** (2008). The tip growth apparatus of *Aspergillus nidulans*. *Mol Biol Cell* **19**, 1439-49.
- Teng, F. Y., Wang, Y. and Tang, B. L.** (2001). The syntaxins. *Genome Biol* **2**, REVIEWS3012.
- TerBush, D. R., Maurice, T., Roth, D. and Novick, P.** (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**, 6483-94.
- Tong, A. H., Lesage, G., Bader, G. D., Ding, H., Xu, H., Xin, X., Young, J., Berriz, G. F., Brost, R. L., Chang, M. et al.** (2004). Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**, 808-13.
- Trautwein, M., Schindler, C., Gaus, R., Dengjel, J., Hartmann, E. and Spang, A.** (2006). Arf1p, Chs5p and the ChAPs are required for export of specialized cargo from the Golgi. *EMBO J* **25**, 943-54.
- Trilla, J. A., Cos, T., Duran, A. and Roncero, C.** (1997). Characterization of *CHS4*

(*CAL2*), a gene of *Saccharomyces cerevisiae* involved in chitin biosynthesis and allelic to *SKT5* and *CSD4*. *Yeast* **13**, 795-807.

Trilla, J. A., Duran, A. and Roncero, C. (1999). Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**, 1153-63.

Valdez-Taubas, J. and Pelham, H. R. (2003). Slow diffusion of proteins in the yeast plasma membrane allows polarity to be maintained by endocytic cycling. *Curr Biol* **13**, 1636-40.

Valdivia, R. H., Baggott, D., Chuang, J. S. and Schekman, R. W. (2002). The yeast clathrin adaptor protein complex 1 is required for the efficient retention of a subset of late Golgi membrane proteins. *Dev Cell* **2**, 283-94.

Valdivia, R. H. and Schekman, R. (2003). The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10287-92.

Valdivieso, M. H., Duran, A. and Roncero, C. (1999). Chitin synthases in yeast and fungi. *Exs* **87**, 55-69.

Valdivieso, M. H., Duran, A. and Roncero, C. (2004). Chitin biosynthesis and morphogenetic processes. In *The Mycota vol III. Biochemistry and Molecular Biology, 2nd Edition*, (eds R. Brambl and G. A. Marzluf), pp. 275-290. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.

Valdivieso, M. H., Ferrario, L., Vai, M., Duran, A. and Popolo, L. (2000). Chitin synthesis in a *gas1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**, 4752-7.

Valdivieso, M. H., Mol, P. C., Shaw, J. A., Cabib, E. and Duran, A. (1991). *CAL1*, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **114**, 101-9.

Wang, C. W., Hamamoto, S., Orci, L. and Schekman, R. (2006). Exomer: A coat complex for transport of select membrane proteins from the trans-Golgi network to the plasma membrane in yeast. *J Cell Biol* **174**, 973-83.

Wesp, A., Hicke, L., Palecek, J., Lombardi, R., Aust, T., Munn, A. L. and Riezman, H. (1997). End4p/Sla2p interacts with actin-associated proteins for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**, 2291-306.

Whitters, E. A., McGee, T. P. and Bankaitis, V. A. (1994). Purification and characterization of a late Golgi compartment from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**, 28106-17.

Zhang, K. and Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* **66**, S102-9.

Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M. S. and Levin, D. E. (1998). Temperature-induced expression of yeast *FKS2* is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**, 1013-22.

Zhou, C., Yang, Y. and Ambrose, Y. J. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*. **8**, 712-713.

Ziman, M., Chuang, J. S. and Schekman, R. W. (1996). Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**, 1909-19.

Ziman, M., Chuang, J. S., Tsung, M., Hamamoto, S. and Schekman, R. (1998). Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**, 1565-76.

