



Tesis Doctoral

Biociencias: Biología y Clínica del Cancer y Medicina Traslacional

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer

CSIC-Universidad de Salamanca

Rachid Taouil Hammouti

**Mecanismos autofágicos implicados en la
defensa innata contra la infección
bacteriana**

Salamanca, 2022

Dr. Felipe Xosé Pimentel Muiños, Científico Titular del Consejo de Investigaciones Científicas y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC, centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca),

CERTIFICA:

Que la presente Tesis Doctoral titulada **“Mecanismos autofágicos implicados en la defensa innata contra la infección bacteriana”** presentada por **Don Rachid Taouil Hammouti**, ha sido realizada bajo su dirección en el IBMCC, y reúne, a su juicio, la originalidad y los contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al **grado de Doctor por la Universidad de Salamanca**.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 20 de abril de 2022.



Fdo.: Dr. Felipe X. Pimentel Muiños

Rachid Taouil Hammouti agraeix l'ajut de tercer cicle al **Govern d'Andorra**, ATCOXX-AND-2017/2020.

A mi madre y familia.

A Rafael y Marisa.

A Mohamade.

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Introducción a la autofagia	1
1.1.1	Origen de la autofagia	1
1.1.2	Características de la autofagia	2
1.1.3	Autofagia y la homeostasis celular	4
1.1.4	Funciones biológicas de la autofagia	4
1.2	La maquinaria molecular de la autofagia y sus mecanismos	5
1.2.1	Inducción y fases de la autofagia	7
1.2.2	Fase 1: m-TOR y AMPK inducen la autofagia	8
1.2.3	Fase 2: Formación de complejos y nucleación del fagóforo	9
1.2.4	Fase 3: Elongación del fagóforo mediante dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina	10
1.2.5	Fase 4: Maduración y reciclaje	14
1.3	Modalidades de la autofagia selectiva	15
1.3.1	Las proteínas adaptadoras de la autofagia	17
1.3.2	Mitofagia	19
1.3.3	Agrefagia	20
1.3.4	Xenofagia	21
1.3.5	Fagocitosis asociada a LC3 (LAP)	21
1.4	Implicación de la autofagia en la salud	22
1.4.1	Enfermedades neurodegenerativas	23
1.4.2	Cáncer	24
1.4.3	Enfermedad de Crohn	25
1.5	Xenofagia	26
1.5.1	Definición de la xenofagia	27
1.5.2	Diferentes tipos de xenofagia	27
1.5.3	Detección de los patógenos en fagosomas por parte del sistema inmune innato	28
1.5.4	Detección de los patógenos en el citoplasma por parte de la maquinaria xenofágica	30
1.5.5	Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores	32
1.6	TMEM59	34
1.6.1	Papel de TMEM59 en distintos procesos fisiopatológicos	35
1.6.2	Trabajo previo del laboratorio	36
2	OBJETIVOS	41
3	MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1	Modelo Animal	45
3.1.1	Manejo y manipulación de animales	45
3.1.2	Generación de un ratón deficiente en TMEM59 mediante la tecnología CRISPR/Cas9	45
3.1.3	Genotipado del gen <i>Tmem59</i>	47
3.1.4	Aislamiento de MEFs de ratón	48

3.1.5	Inmortalización de MEFs primarios con antígeno T de SV40	49
3.1.6	Estudios de patología de ratón.....	49
3.2	Cultivos celulares.....	49
3.2.1	Líneas celulares.....	49
3.2.2	Condiciones para el cultivo celular.....	50
3.2.3	Mantenimiento celular.....	50
3.2.4	Congelación y descongelación de líneas celulares.....	51
3.3	Obtención de líneas celulares estables mediante transducción retroviral	51
3.3.1	Características del vector retroviral.....	51
3.3.2	Procedimiento para generar líneas celulares estables vía retroviral	52
3.4	Métodos de biología molecular.....	53
3.4.1	Amplificación por PCR	53
3.4.2	Diseño de los oligonucleótidos cebadores para la PCR.....	55
3.4.3	Digestión del vector y el inserto con enzimas de restricción, purificación de los fragmentos de DNA y ligación	56
3.4.6	Preparación de DNA plasmídico a gran escala	58
3.5	Lisis de células en cultivo.....	59
3.5.1	Lisis celular mediante el buffer SB2x	59
3.5.2	Medición de la concentración de proteínas en los extractos celulares	59
3.6	Western-Blot.....	60
3.6.1	Electroforesis de proteínas sobre el gel de poliacrilamida y Western Blot	60
3.6.2	Preparación de geles de poliacrilamida	61
3.6.3	Preparación de muestras para electroforesis (PAGE)	62
3.6.4	Transferencia de proteínas para Western blot.....	62
3.6.5	Incubación con anticuerpos primarios y secundarios.....	63
3.6.6	Revelado de las membranas de Western Blot.....	63
3.7	Ensayos de inmunofluorescencia.....	64
3.8	Ensayos de infección bacteriana	65
3.8.1	Preparación de las bacterias	65
3.8.2	Infección celular con las bacterias.....	66
3.8.3	Tipos de bacterias y condiciones de crecimiento	67
3.8.4	Tratamiento de los datos estadísticos.....	68
4	RESULTADOS.....	73
5	DISCUSIÓN	77
5.1	Estudios patológicos en los ratones deficientes en <i>Tmem59</i>	77
5.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	78
5.3	<i>Streptococcus pyogenes</i>	81
5.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	84
5.5	<i>Salmonella typhimurium</i>	86
5.6	<i>Shigella flexneri</i>	90
6	CONCLUSIONES	95

7 *REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*..... 99
8 *AGRADECIMIENTOS*..... 139

Figuras

Figura 1. Esquema de las principales etapas de autofagia.6

Figura 3. Principales factores implicados en la fusión de autofagosomas con los lisosomas en células humanas.. 15

Figura 4. Esquema conceptual de la autofagia selectiva 18

Figura 5. Las células se defienden de patógenos mediante xenofagia y fagocitosis asociada a LC3...31

Figura 6. Esquema de los fragmentos de DNA esperados para cada genotipo de Tmem59 tras la digestión del amplicón de PCR con HincII..... 48

ABREVIATURAS

Abreviaturas

A

AD: Alzheimer's disease; enfermedad de Alzheimer

ATGX: ATGX: autophagy-related gene X; gen relacionado con autofagia X

ATP: Adenosín trifosfato; adenosina trifosfato

ALS: autophagy-lysosome system; sistema autofagia-lisosoma

ALFY: autophagy-linked FYVE protein; proteína FYVE ligada a autofagia

AMP: AMP: adenosine monophosphate; adenosín monofosfato

AMPK: AMP-activated protein kinase; proteína quinasa activada por AMP

AMBRA1: activating molecule in Beclin1-regulated autophagy; molécula activadora en la autofagia regulada por Beclin1

APP: amyloid precursor protein; proteína precursora de amiloide

B

BECN1: Beclin-1

BFA1: bafilomycin A₁; bafilomicina A₁

BSA: bovine serum albumin; albúmina de suero bovino

C

C57BL/6J: C57 black 6

CALCOCO2/NDP52: calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2/nuclear dot protein 52; proteína 2 de unión a calcio que contiene un dominio coiled-coil/proteína de puntos nucleares 52

ABREVIATURAS

Cas9: CRISPR associated protein 9; proteína 9 asociada a CRISPR

CIP: calf-intestinal alkaline phosphatase; fosfatasa intestinal alcalina de ternero

CFU: colony-forming unit; unidad formadora de colonias

CMA: chaperone-mediated autophagy; autofagia mediada por chaperonas

CMV: citomegalovirus; citomegalovirus

D

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2 fenilindol

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's médium; medio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimethyl sulfoxide; dimetilsulfóxido

DNA/cDNA: deoxyribonucleic acid/complementary DNA; ácido desoxirribonucleico/DNA complementario

DCF1: dendritic cell-derived factor 1; factor 1 derivado de células dendríticas

E

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid; ácido etilendiaminotetraacético

E-GFP: enhanced green fluorescent protein; proteína verde fluorescente mejorada

EC: enfermedad de Crohn

ERK: extracellular signal-regulated kinase; quinasa regulada por señales extracelulares

F

FBS: fetal bovine serum; suero bovino fetal

FIP200: FAK family kinase-interacting protein 200 kDa; proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las FAK quinasas

G

GABARAP: gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein; proteína asociada al receptor del ácido gamma-aminobutírico

GTPasas: guanosine triphosphate; guanosina trifosfatasa

GFP: green fluorescent protein; proteína verde fluorescente

GTP: guanosine triphosphate; guanosín trifosfato

GAL-3: galectin 3; galectina 3

H

HEK-293T: human embryonic kidney 293 cells transformed with large T antigen (SV40, simian virus 40); células 293 embrionarias de riñón humano transformadas con el antígeno T del virus SV40 (virus 40 del simio)

HRAS: Harvey Rat sarcoma virus; virus del sarcoma de la rata Harvey

HOPS: Homotypic fusion and protein sortin; proteína de fusión homotípica y clasificación de proteínas

I

IF: immunofluorescence; inmunofluorescencia

IRGM1: immunity-related GTPase family M protein 1; proteína GTPasa 1 de la familia M relacionada con inmunidad

IFN- γ : interferon gamma; interferón gamma

J

JAK2: Janus kinase 2; Janus quinasa 2

K

Kb: kilobase; kilobase

ABREVIATURAS

KRAS: Kirsten rat sarcoma virus; virus del sarcoma de rata de Kirsten

L

LAMP1: lysosomal-associated membrane protein 1; proteína 1 asociada a la membrana lisosomal

LAMP2-A: lysosomal associated membrane protein 2; proteína 2A asociada a la membrana lisosomal

LB: Luria Bertani

LC3: microtubule-associated protein light chain 3; proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos

LAP: LC3-associated phagocytosis; La fagocitosis asociada a LC3

LLO: listeriolysin O; listeriolisina O

LPS: lipopolysaccharide; lipopolisacárido

LTR: long terminal repeat; repeticiones terminales largas

M

MAPK: mitogen-activated protein kinase; proteína quinasa activada por mitógenos

MEF: mouse embryonic fibroblasts; fibroblastos embrionarios de ratón

MHC-II: major histocompatibility complex II; complejo mayor de hitocompatibilidad de clase II

MOI: multiplicity of infection; multiplicidad de infección

mTORC1/2: mammalian target of rapamycin complex 1/2; diana de rapamicina en mamíferos complejo 1/2

MVP: Major Vault Protein; Proteína de la bóveda principal

N

NBR1: next to BRCA1 gene 1 protein; proteína 1 junto al gen BRCA1

NLR: Nod-like receptor; receptor de tipo Nod

NBR1: Next to BRCA1 gene 1 protein; Junto a la proteína del gen 1 BRCA1

NOD2: nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2; proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos

NLR: Nod-like receptor; receptor de tipo Nod

NPY: neuropeptide Y; neuropéptido Y

O

OPTN: optineurin; optineurina

P

PAMP: pathogen-associated molecular pattern; patrón molecular asociado a patógenos

PARKIN: parquin; parkina

PBS: phosphate buffered saline; tampón fosfato salino

PCR: polymerase chain reaction; reacción en cadena de la polimerasa

PGRP: Peptidoglycan recognition proteins; las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano

PE: phosphatidylethanolamine; fosfatidiletanolamina

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; fosfoinositol-3-quinasa o fosfatidilinositol 3-quinasa

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate; fosfatidilinositol-3-fosfato

PINK: PTEN-induced kinase 1; quinasa inducida por PTEN 1

PRR: pattern recognition receptors; receptores de reconocimiento de patrones

PVDF: polyvinylidene fluoride; polifluoruro de vinilideno

ABREVIATURAS

PI3K: phosphatidylinositol 3-kinase; fosfoinositol-3-quinasa o fosfatidilinositol 3-quinasa

PI3P: phosphatidylinositol 3-phosphate; fosfatidilinositol-3-fosfato

PAS: phagophore assembly site; sitio de ensamblaje del fagóforo

p53: Cellular tumor antigen p53; Antígeno tumoral celular p53

R

RAS: rat sarcoma protein; proteína de sarcoma de rata

RNA/mRNA: ribonucleic acid/messenger RNA; ácido ribonucleico/RNA mensajero

ROS: reactive oxygen species; especies reactivas de oxígeno

RILP: Rab-interacting lysosomal protein; proteína lisosomal de interacción con Rab

RSB: reducing sample buffer; buffer reductor para muestra

RE: retículo endoplasmático

RABX: Ras-associated binding protein X; proteína de unión X asociada a Ras

RUBICON: Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein;
Ejecute el dominio que interactúa con Beclin-1 y la proteína que contiene un dominio rico en
cisteína

S

SB: sample buffer; buffer para muestra

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; electroforesis en gel
de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SQSTM1/p62: sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62; proteína de unión a
ubiquitina p62

SNARE: soluble NSF attachment protein receptor; receptor de proteínas de unión de NSF
Soluble

SQSTM1/p62: sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62; proteína de unión a ubiquitina p62

STAT1/3/5: signal transducer and activator of transcription 1/3/5; transductor de la señal y activador de la transcripción 1/3/5

SLO: streptolysin O; estreptolisina O

T

TAE: tris acetate-EDTA buffer; buffer tris acetato-EDTA

TBS: tris-buffered saline; solución salina tamponada con tris

TE: buffer tris-EDTA; tampón tris-EDTA

TEMED: N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine; N, N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TLRX: Toll-like receptor X; receptor de tipo Toll X

TMEMX: transmembrane protein X; proteína transmembrana X

TOLLIP: Toll interacting protein; proteína de interacción con Toll

TRIM20: Tripartite motif 20; motivo tripartito 20

TSC1/TSC2: tuberous sclerosis complex 1/2; complejos 1/2 de esclerosis tuberosa

(TLR): toll-like receptor; receptores tipo toll

TMEM59: Transmembrane protein 59; proteína transmembrana 59

T3SS: Type three secretion system; sistema de secreción de tipo III

U

UPS: ubiquitin/proteasome system; sistema ubiquitina/proteasoma

ULK1/2: Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2; quinasa 1/2 activadora de la autofagia similar a unc-51

ABREVIATURAS

UVRAG: UV radiation resistance-associated gene protein; Proteína génica asociada a la resistencia a la radiación UV

V

VAMPX: vesicle-associated membrane protein; proteína de membrana asociada a vesículas

VPSX: vacuolar protein sorting-associated protein X; proteína X asociada a la clasificación de proteínas vacuolares

W

WB: Western-blot

WIPI: WD-repeat protein interacting with phosphoinositides; proteína con repeticiones WD que interacciona con fosfoinositol

Z

ZFYVE1: Zinc finger FYVE-Type containing 1; la proteína 1 que contiene el dominio FYVE con dedos de zinc

RESUMEN

RESUMEN

La autofagia es un término genérico designado para diferentes vías que involucran la degradación y el reciclaje celular de múltiples cargos citoplasmáticos durante condiciones fisiológicas estándar y en respuesta a diferentes de tipos de estrés, como el ayuno. Esta degradación se produce en el interior de vesículas citoplasmáticas de doble membrana denominadas autofosomas. Aunque originalmente se pensaba que la autofagia era un proceso de degradación no selectivo, estudios más recientes han demostrado que la autofagia funciona de forma selectiva en determinadas condiciones. Esta autofagia selectiva desempeña funciones importantes en el control de calidad intracelular eliminando agregados de proteínas, orgánulos dañados y patógenos intracelulares, lo cual es importante tanto para la célula como para el organismo en su conjunto. Estas funciones celulares básicas de la autofagia selectiva protegen a nivel de organismo contra numerosas enfermedades, incluidas las infecciones, el cáncer, la neurodegeneración, enfermedades autoinmunes, trastornos cardiovasculares, diabetes y envejecimiento.

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad genética compleja y multifactorial. Estudios de asociación genética han contribuido a la identificación de moléculas involucradas en el inicio y desarrollo de la EC. En dichos estudios se han identificado diferentes polimorfismos de riesgo que corresponde a moléculas que median la inmunidad innata y la autofagia, como son NOD2 y ATG16L1 entre otras. NOD2 desempeña un papel crucial en el reclutamiento de ATG16L a la membrana plasmática durante la invasión bacteriana. Por otro lado, el polimorfismo T300A, localizado en el dominio WD40 de la molécula autofágica ATG16L1, también se asocia a un mayor riesgo de sufrir la EC. La presencia de este polimorfismo parece alterar las actividades de autofagia no convencional llevadas a cabo por esta región de ATG16L1, afectando al proceso de eliminación de patógenos intracelulares o xenofagia mediado por esta molécula.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que el dominio WD40 de ATG16L1 interacciona con la proteína transmembrana de Tipo-I TMEM59 para inducir un fenómeno autofágico atípico que es diferente del mecanismo autofágico canónico. Otros estudios adicionales del laboratorio indican que este mecanismo novedoso inducido por TMEM59 está implicado en la defensa innata celular contra la bacteria infecciosa *Staphylococcus aureus*. Además, este proceso de autofagia atípica mediado por TMEM59 se ve alterado en presencia del alelo de riesgo de T300A de ATG16L1, dificultando así la defensa xenofágica contra la infección bacteriana.

Este trabajo de Tesis Doctoral se ha abordado con la intención de evaluar la función fisiológica de TMEM59 a nivel de organismo mediante la generación de un ratón deficiente en esta molécula. De forma más específica, el propósito ha sido estudiar el papel que desempeña TMEM59 a nivel celular y en el organismo completo contra las infecciones bacterianas.

INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Introducción a la autofagia

1.1.1 Origen de la autofagia

El campo de autofagia inició su andadura sobre los años 50 del siglo pasado, gracias al descubrimiento de un nuevo tipo de orgánulo con una función lítica¹ por parte de Christian De Duve², que posteriormente nombró como “lisosoma” para así reflejar su propiedad lítica. El estudio se basó en un primer momento en la actuación de la insulina sobre las células hepáticas, donde acabó observando la degradación de las mitocondrias y otros componentes intracelulares dentro de los lisosomas de las células del hígado de ratas (perfundido con glucagón)³. Para complementar este hallazgo, Alex Novikoff llevó a cabo estudios mediante microscopía electrónica, en los que fue capaz de obtener las primeras imágenes de este nuevo orgánulo⁴. Posteriormente, también en dichas vesículas, se aislaron e identificaron varias enzimas digestivas contenidas en su interior¹.

Por otra parte, Werner Straus aportó una función importante de los lisosomas. Straus quería desentrañar cómo algunas moléculas extracelulares eran capaces de entrar dentro las células a través de un proceso conocido como la endocitosis. Para ello, marcó las proteínas para poder seguir las, y observó que los fragmentos de las proteínas marcadas estaban dentro de los lisosomas descritos por De Duve, concluyendo por tanto que las proteínas acaban degradándose en los lisosomas⁵. Por otro lado, Zanvil Cohn infectó macrófagos con bacterias radioactivas. En este experimento se observó que los fragmentos de las moléculas radiactivas de las bacterias se acumulaban en los lisosomas, llegando así a la conclusión de que las bacterias también son digeridas por estos orgánulos⁶.

Con estos avances, De Duve en 1963 denominó por primera vez “autofagia” (en griego que tiene como significado, “auto comerse”) al proceso de entrega del material citoplasmático a los lisosomas para su posterior degradación⁷. Hoy en día, está bien demostrado que los lisosomas contienen hidrolasas que son capaces de digerir cualquier tipo de macromoléculas.

1 INTRODUCCIÓN

En 1974 De Duve fue galardonado con el Premio Nobel de fisiología y Medicina por este nuevo campo de investigación.

A pesar de estos excelentes progresos, las moléculas que regulan la inducción de autofagia o las implicaciones fisiopatológicas de este proceso todavía no se conocían. No fue hasta la década de los años 90, cuando Yoshinori Ohsumi descubrió que la autofagia también ocurre en las levaduras, un sistema que facilitaría el aislamiento y la caracterización de los genes ATGs (genes relacionados con autofagia)⁸ en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁹. Por tanto, a partir de este momento, la posibilidad de utilizar levaduras como modelo experimental abrió la puerta al estudio de la biología molecular de la autofagia. En 2016, Ohsumi recibió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina por estos hallazgos.

1.1.2 Características de la autofagia

La autofagia es un término genérico designado para todas aquellas vías que involucran el reciclaje celular de múltiples cargos citoplasmáticos (el término cargo de ahora en adelante hace referencia a cualquier parte intracelular) durante las condiciones fisiológicas estándar y en respuesta a diferentes tipos de estrés, como el ayuno. La degradación y reciclaje de estos componentes se efectúa a través la vía lisosomal en las células de mamíferos o de las vacuolas en el caso de células vegetales y de levaduras^{10,11} (Figura 1). La autofagia está altamente conservada desde la levadura hasta los mamíferos, tanto morfológicamente como en relación a los constituyentes proteicos que componen la maquinaria central de la autofagia^{12,13}.

En las células eucariotas se han descrito y clasificado al menos 3 formas distintas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (CMA, del inglés *chaperone mediated-autophagy*)¹⁴. Esta clasificación viene definida en función de cómo se transfieren los componentes citosólicos hacia el lumen de los lisosomas, para así llevar a cabo su degradación¹⁵. En realidad, aunque estos procesos tengan en común la intervención de los lisosomas, difieren en las condiciones de la activación de uno o de otro, en la naturaleza del cargo, en la señal o señales inductoras, el método de selección del cargo, las características del cargo, captura del material citosólico y la liberación en el lumen de los lisosomas¹⁵. Por tanto, estos procesos ocurren a través de distintas vías y mecanismos moleculares.

La macroautofagia (de ahora en adelante autofagia) es un tipo de proceso autofágico en el que los cargos a eliminar son secuestrados por una estructura de doble membrana, que finalmente acaba cerrándose para formar una vesícula denominada autofagosoma¹⁶ (Figura 1). Los cargos de esta autofagia incluyen orgánulos superfluos y dañados, agregados proteicos y microbios invasores. Este autofagosoma acaba fusionando con los lisosomas, para así, degradar los sustratos mediante las hidrolasas ácidas que contienen en el lumen lisosomal¹⁷⁻¹⁹. Es el tipo de autofagia mejor caracterizado en las células animales y se describirá el mecanismo molecular general en el apartado 1.2 La maquinaria molecular de la autofagia y sus mecanismos.

La modalidad de CMA, hasta ahora identificada solamente en las células de los mamíferos, es un tipo de autofagia selectiva capaz únicamente de degradar las proteínas citosólicas que contengan el motivo pentapéptido KFERQ. Estos motivos están presentes en aproximadamente 40% de las proteínas en los proteomas de mamíferos²⁰. Este proceso de CMA comienza con el reconocimiento de los motivos KFERQ por parte de la chaperona HSC70 (del inglés, *heat shock cognate protein of 70kDa*)²¹. Una vez formado el complejo chaperona-sustrato, éste es dirigido hacia la membrana lisosomal. A continuación, este complejo de HSC70-sustrato acaba asociándose al receptor LAMP2-A de la membrana lisosomal. Como resultado, la proteína es desplegada y es translocada dentro del lumen lisosomal a través de unos complejos de translocación, para llevar a cabo su degradación^{22,23}.

En la microautofagia el material citoplasmático a degradar es directamente captado por las membranas de los lisosomas o endosomas, (o por las vacuolas en las levaduras) ya sea por invaginaciones o por protuberancias. A diferencia de CMA, las porciones del citosol que se degradan por microautofagia pueden ser específicas o inespecíficas^{24,25}. Desafortunadamente, los mecanismos y el rol de la microautofagia permanecen en gran medida desconocidos, particularmente en las células de los mamíferos.

Las células utilizan estos diferentes tipos de autofagia según la situación para mantener su homeostasis o regular sus funciones biológicas²⁶.

1.1.3 Autofagia y la homeostasis celular

Las células han desarrollado procesos de control de calidad citoplasmática para adaptarse al medio y prevenir daños prolongados. Estos procesos ocurren básicamente a través de dos sistemas proteolíticos: el sistema de ubiquitina proteasoma (UPS, por sus siglas en inglés *ubiquitin/proteasome system*) y el sistema autofagia-lisosoma (ALS, por sus siglas en inglés *autophagy-lysosome system*)²⁷⁻²⁹. El proceso UPS está limitado a degradar proteínas pequeñas y de vida media corta. Además, la degradación mediante UPS da como resultados péptidos cortos (de 8 a 12 residuos) que pueden servir para alimentar procesos adicionales como es la presentación de antígenos en la membrana plasmática³⁰. Por el contrario, ALS emplea hidrolasas lisosomales que son capaces de degradar proteínas mal plegadas, macromoléculas, agregados de proteínas, orgánulos dañados e incluso microorganismos invasores³¹ (Figura 1).

Este proceso ALS (o denominado simplemente autofagia) es un proceso catabólico de degradación y reciclaje que ocurre a nivel intracelular. La autofagia desempeña una función de control de calidad esencial en la célula al promover la renovación basal de proteínas y orgánulos de larga duración, así como al degradar selectivamente componentes celulares dañados o microorganismos patogénicos³². A continuación, el material degradado en los lisosomas se vuelve a introducir en el citosol como moléculas esenciales (lípidos, azúcares, aminoácidos y ácidos nucleicos) que pueden actuar como sustratos en vías anabólicas o también como fuente de energía en vías catabólicas¹⁰, según las necesidades celulares para mantener su integridad y viabilidad¹³.

Por lo tanto, la autofagia es un mecanismo esencialmente de supervivencia celular, y está involucrada en muchos procesos fisiológicos como la generación de aminoácidos durante los periodos de ayuno, control de calidad de proteínas y orgánulos intracelulares, regulación de expresión de sustratos selectivos y presentación de los antígenos, entre otros⁹.

1.1.4 Funciones biológicas de la autofagia

La autofagia realiza varias funciones celulares primarias, como la desintoxicación celular o conferir resistencia y adaptación a diferentes formas de estrés (hipoxia, ayuno, infección)³³, y la eliminación de componentes no deseados, dañados o peligrosos³⁴, y por tanto juega un

papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. Después de la degradación, los productos obtenidos se vuelven a liberar en el citosol para reciclar los constituyentes macromoleculares necesarios y generar energía para mantener la viabilidad celular en condiciones desfavorables, y así proteger la célula durante diversas condiciones de estrés³⁵.

En segundo lugar, la autofagia representa un mecanismo que mantiene el control de la calidad intracelular al eliminar agregados de proteínas, orgánulos dañados y patógenos intracelulares, lo cual es importante tanto para la célula como para el organismo en su conjunto³⁶. A través de esta función básica, la autofagia juega un papel crucial en la fisiología celular, incluida la renovación de orgánulos durante la diferenciación y desarrollo, la prevención del daño genómico en las células madre, la longevidad y la muerte celular. Estas funciones básicas hacen imprescindible la correcta función de la autofagia para el buen desarrollo celular. Aunque la autofagia es un mecanismo de supervivencia y de adaptación celular a su entorno, no siempre ocurre así, puesto que cuando la autofagia se induce de modo exacerbado y prolongado puede llevar a la muerte celular³⁷. No obstante, en la actualidad no está claro qué mecanismos moleculares, estímulos externos o vías de señalización promueven la muerte celular autofágica y si existe un cierto umbral de autofagia que, una vez superado, se vuelve perjudicial para la célula³⁸. En todo caso, estas funciones celulares básicas de la autofagia protegen a nivel de organismo contra numerosas enfermedades, incluidas infecciones, cáncer, neurodegeneración, enfermedades autoinmunes, enfermedad hepática, trastornos cardiovasculares, diabetes y envejecimiento³⁹.

1.2 La maquinaria molecular de la autofagia y sus mecanismos

Nuestra comprensión básica de los mecanismos moleculares de la autofagia proviene principalmente del estudio de un conjunto de genes relacionados con la autofagia (ATG, por sus siglas en inglés *autophagy-related gene*) identificados a partir de cribados genéticos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁴⁰. La mayoría de estos genes tienen sus ortólogos en metazoos superiores y conservan sus funciones originales. Con la expansión funcional de la familia de genes ATGs y sus implicaciones en la formación de los autofagosomas, estas proteínas son consideradas como señas de identidad del proceso de autofagia en mamíferos⁴¹. El transcurso de autofagia se puede dividir en varias etapas distintas: inducción, nucleación de

1 INTRODUCCIÓN

un intermediario de doble membrana denominado fagóforo, elongación, reconocimiento del cargo por parte del fagóforo, maduración, el sellado del fagóforo para dar un autofagosoma, fusión de autofagosomas con los lisosomas, descomposición y reciclaje de las macromoléculas resultantes (Figura 1)⁴².

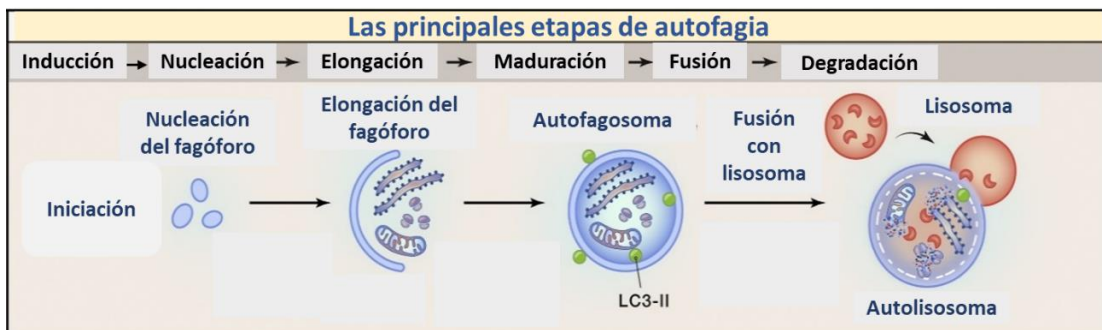


Figura 1. Esquema de las principales etapas de autofagia. Una vez inducida la autofagia, esta se puede dividir en varias etapas distintas: iniciación, nucleación de un intermediario de doble membrana denominado fagóforo, elongación, reconocimiento del cargo por parte del fagóforo, maduración en un autofagosoma, fusión de autofagosomas con los lisosomas, descomposición y reciclaje de las macromoléculas resultantes. (Imagen modificada de la Dra. Beth Levine)¹⁵

La formación de un autofagosoma requiere un subconjunto de proteínas ATGs que se reclutan en el sitio de nucleación de manera jerárquica⁴³. Este subconjunto de proteínas se conoce como “la maquinaria autofágica central”, y está conservada en gran medida entre levaduras y mamíferos⁴⁴. Estos factores se pueden agrupar en unidades funcionales que incluyen: **(1)** el complejo quinasa ULK1, **(2)** el complejo PI3KC3, **(3)** el sistema cíclico ATG9A, **(4)** las proteínas WIPs, **(5)** dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina, el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 y LC3/GABARAP⁴⁵.

Uno de los objetivos más relevantes de la acción combinada de estas proteínas es la unión covalente de las proteínas de la familia ATG8/LC3 de tipo ubiquitina a la fosfatidiletanolamina (PE), un lípido enriquecido de la membrana del fagóforo⁴⁶. La lipidación de la familia de las proteínas ATG8/LC3 desempeña un rol muy importante en la vía de autofagia, ya que esta modificación lipídica recluta ATG8/LC3 a la superficie del autofagosoma incipiente donde coordina varios procesos clave como la nucleación del fagóforo, elongación⁴⁷ y la formación del autofagosoma completo⁴⁸, su transporte y tráfico por el citoplasma⁴⁹, su fusión con los

lisosomas⁵⁰, o el reconocimiento del cargo.⁵¹ Sin embargo, no está claro hasta qué punto difieren los miembros individuales de esta familia y cuáles son los detalles moleculares exactos que dictan estas grandes diferencias biológicas¹⁵.

1.2.1 Inducción y fases de la autofagia

La autofagia transcurre a través de múltiples pasos altamente regulados. En condiciones normales los niveles basales de autofagia son bajos, pero pueden ser fuertemente inducidos por el estrés y varios tipos de estímulos, indicando que la rápida movilización de la autofagia es parte de la respuesta integral al estrés⁵². Entre estos estímulos se incluyen el ayuno (falta de glucosa, aminoácidos), la falta de factores de crecimiento (por ejemplo insulina), la reducción de niveles de energía (por ejemplo ATP), tratamiento con agentes farmacológicos (por ejemplo rapamicina) estrés tanto extra como intracelular (hipoxia, estrés oxidativo, estrés del retículo endoplasmático e infecciones patógenas)^{53,54}. Por lo tanto, los mecanismos de inducción de esta actividad son cruciales para que los organismos puedan adaptarse a estos tipos de estrés. El resultado de esta inducción inicial es el reclutamiento de un conjunto de proteínas ATGs en una ubicación subcelular específica denominada sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS, por sus siglas en inglés)⁵⁵ en levaduras, y omegasoma en las células de los mamíferos. Esta estructura inicia la nucleación de una membrana de aislamiento, que acaba formando una estructura en forma de copa denominado fagóforo (Figura 1). A continuación, este fagóforo sigue alargándose de manera curvada hasta sellarse como una vesícula de doble membrana, denominada autofagosoma. La finalidad de este proceso es atrapar en el lumen del autofagosoma el material citosólico de interés que se conoce como cargo autofágico (Figura 1). Finalmente, este autofagosoma es transportado a través de los microtúbulos hasta el lisosoma, y la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana lisosómica para así formar un autolisosoma. Tras la formación del autolisosoma, los cargos, así como la membrana interna del autofagosoma, son procesados y degradados por hidrolasas intralisosomales y luego recicladas al citoplasma en forma de moléculas esenciales, para así participar en la próxima ronda de biosíntesis o en las vías catabólicas para la generación de energía^{56,57}.

1.2.2 Fase 1: m-TOR y AMPK inducen la autofagia

Las células y los organismos necesitan integrar información del medio ambiente para asegurarse de que solo crezcan cuando las condiciones son favorables. El complejo mTORC1/2 (mTORC1/2, por sus siglas en inglés *mammalian target of rapamycin complex 1/2*) es un integrador clave de las señales tanto intra como extracelulares, incluidas la disponibilidad de nutrientes, factores de crecimiento y así como otros tipos de estrés⁵⁸, regulando así el metabolismo, crecimiento, proliferación y supervivencia celulares⁵⁹. Por otro lado, la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés *AMP-activated protein kinase*) es un regulador importante de la homeostasis energética celular y del organismo, detectando cambios en la ratio AMP/ATP para controlar múltiples vías metabólicas que equilibran la oferta y la demanda de energía⁶⁰.

La autofagia inducida por estrés está controlada principalmente por estos dos nodos críticos: el complejo mTORC1 y el complejo AMPK. El complejo mTORC1 es caracterizado por ser un potente inhibidor de la autofagia en todas las células eucariotas^{61,62}. En presencia de aminoácidos y factores de crecimiento, mTORC1 es activado en la superficie de la membrana lisosomal asociándose con el complejo quinasa ULK1 (compuesto por las subunidades ULK1/2 (funcionalmente redundantes), ATG13, ATG101 y FIP200/RB1CC1)^{63,64}. Como consecuencia, mTORC1 inhibe la autofagia mediante la fosforilación de ATG13 y ULK1 del complejo para reprimir su actividad⁶⁵. En cambio, en condiciones de ayuno, mTORC1 es inhibido por el complejo TSC1/2 y, como resultado, ULK1 sufre autofosforilación y a su vez fosforila a las subunidades de ATG13 y FIP200, lo que lleva a la activación del complejo quinasa ULK1 iniciadora de la autofagia^{66,67}. Por tanto, mTORC1 actúa como un sensor de la concentración de aminoácidos. De igual modo, estudios recientes también han demostrado vías alternativas involucradas en la regulación de la autofagia que son independientes de mTORC1^{68,69}.

Por otro lado, AMPK es un regulador positivo importante de la autofagia que se activa mediante una alta proporción de AMP frente al ATP, actuando, así como un sensor de energía⁷⁰. La caracterización molecular de AMPK ha revelado que controla la autofagia en dos niveles diferentes. En el primer nivel, en condiciones de baja energía intracelular, AMPK se activa y fosforila directamente tanto al complejo TSC como a Raptor (una subunidad de

mTORC1)⁷¹. Ambos eventos de fosforilación participan en la reducción de la actividad de mTOR en condiciones de estrés energético. Como se mencionó anteriormente, la inhibición de mTOR alivia la fosforilación inhibitoria que ejerce sobre el complejo ULK1. El segundo nivel consiste en que, una vez activado AMPK, ésta fosforila directamente el complejo ULK1 en al menos cuatro residuos, provocando así la activación de la autofagia a través de este complejo⁷².

Por tanto, la autofagia está regulada de forma crítica por AMPK y mTORC1, que activan las vías catabólicas y anabólicas (respectivamente) e interactúan para controlar el equilibrio metabólico y mantener la homeostasis energética⁷³. Al final de este proceso, mTORC1 se vuelve a activar para favorecer la regeneración de los lisosomas a partir de los autofagolisomas mediante el reciclaje de éstos y la emisión de vesículas que serán inicialmente prolisosomas que acabarán madurando hasta convertirse en lisosomas⁷⁴.

1.2.3 Fase 2: Formación de complejos y nucleación del fagóforo

Este proceso está regulado básicamente por una serie de complejos de proteínas ATGs que forman la maquinaria de autofagia central y son directamente responsables de la inducción de la formación y tráfico de los autofagosomas⁷⁵.

Como se ha comentado en los párrafos anteriores (*Inducción y fases de la autofagia*), la limitación de nutrientes inicia una cascada de señalización intracelular que acaba desactivando mTORC1. Como resultado el complejo ULK1 se disocia de mTORC1 y al mismo tiempo, la subunidad ULK1 sufre autofosforilación, y seguidamente fosforila ATG13 y FIP200 para inducir autofagia^{67,76,26}. A continuación, el complejo ULK1 activado recluta y activa al complejo fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (PI3KC3), también conocido como el complejo Beclin-1 (compuesto por las subunidades de PIK3C3/VPS34, BECN1, PIK3R4/VPS15, y ATG14 o UVRAG)^{77,78}, siendo esencial para el inicio de la nucleación del fagóforo (figura 2). Para ello, el complejo ULK1 fosforila AMBRA1 para liberar el complejo Beclin-1 del citoesqueleto y ATG14L se transloca al sitio de inicio para la formación de autofagosomas dirigiendo a todo el complejo Beclin-1 al lugar de nucleación^{79,80}. Posteriormente, el complejo ULK fosforila y activa a BECN1⁸¹, siendo éste un evento imprescindible para la iniciación de la autofagia. La subunidad de VPS34 de este complejo también se activa y es la que desencadena la nucleación del fagóforo, ya que cataliza la conversión de fosfatidilinositol local a fosfatidilinositol-3-fosfato

(PI3P o PtdIns3P)⁸² en una estructura característica del retículo endoplasmático. El PI3P generado sirve como una señal para reclutar varias proteínas efectoras, tales como ATGs, WIPIs y ZFYVE1 que reconocen y se unen preferentemente a PI3P en el sitio de nucleación^{83,84} (Figura 2). A continuación, las proteínas WIPI1 y WIPI2 se unen directamente al PI3P⁸⁵, y sirven de andamiaje para reclutar el complejo ATG16L1 (compuesto por ATG5-ATG12-ATG16L1)^{86,87}. El reclutamiento de estos complejos al sitio de nucleación de omegasomas provoca la lipidación de ATG8/LC3 y la expansión de la membrana para formar un precursor del autofagosoma en forma de copa denominado fagóforo^{88,89} (ver más abajo, Fase 3).

Existe cierto consenso de que en las células de mamífero los omegasomas se originan en unos subdominios especializados del retículo endoplasmático que están enriquecidos con PI3P⁹⁰⁻⁹³. En todo caso, la membrana plasmática, las mitocondrias, compartimento intermedio RE-Golgi, vesículas COPII y vesículas ATG9 también han sido propuestos como fuentes de membranas durante el proceso de expansión del fagóforo para formar el autofagosoma⁹⁴⁻⁹⁷. Por otro lado, ATG13 interactúa con ATG9 para reclutar vesículas de ATG9A a la estructura pre-autofagosomal, suministrando así lípidos a los fagóforos⁹⁸ (Figura 2). En ausencia de autofagia, ATG9 se localiza en la red trans-Golgi y endosomas tardíos. Sin embargo, cuando hay señales inductoras de autofagia ATG9 transita al sitio de nucleación y aporta lípidos para la formación de un autofagosoma completo⁹⁹.

1.2.4 Fase 3: Elongación del fagóforo mediante dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina

La expansión y elongación de fagóforo requiere dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina: el sistema ATG12 y el sistema LC3. Ambos sistemas son necesarios para efectuar la conjugación de LC3 con fosfatidiletanolamina (LC3-PE o LC3-II), un proceso que se conoce como lipidación de LC3^{100,101}.

El primer sistema está compuesto por ATG12, ATG5 y ATG16L1, que se ensamblan en un complejo cuya formación implica una reacción de conjugación¹⁰². Así, ATG5 y ATG12 se conjugan de manera covalente mediante la intervención de dos enzimas, una de activación ATG7 (E1) y una de conjugación ATG10 (E2) para obtener dímeros ATG5-ATG12. A continuación, ATG16L1 se une al ATG5-ATG12 de manera no covalente, para dar lugar al

complejo multimérico ATG5-ATG12-ATG16L1. Como se ha dicho en el apartado anterior, este complejo ATG16L1 generado acaba uniéndose a la región de WIPI2-PI3P de la membrana del fagóforo con el objetivo de contribuir al proceso de elongación y formación del autofagosoma a través de un segundo paso de conjugación^{85,86,103} (Figura 2).

El segundo sistema involucrado en la elongación del fagóforo implica a las proteínas de la familia de ATG8/LC3. Para efectuar la conjugación del precursor LC3 a la membrana del fagóforo, se requieren una serie de pasos previos de activación en los que intervienen diferentes tipos de enzimas. En primer lugar, el precursor proLC3/GABARAP es sometido a un proceso de proteólisis mediante la cisteína proteasa ATG4B, un paso que expone una glicina en el extremo C-terminal de LC3¹⁰⁴ y genera la forma de LC3-I que se encuentra soluble en el citosol. Luego, este producto de LC3-I citosólico es procesado por una enzima de activación ATG7 (E1) y una enzima de conjugación ATG3 (E2). Finalmente, interviene el sistema ATG12 para completar la reacción de conjugación en la que la glicina del C-terminal de LC3 forma un enlace covalente con PE, para así dar lugar al LC3-II (LC3 formando un enlace covalente con PE (PE-LC3))¹⁰⁵. En este proceso el complejo ATG5-ATG12 hace la función de enzima ligasa (E3), mientras que ATG16L1 determina el lugar de lipidación del LC3-I¹⁰⁶ (Figura 2).

1 INTRODUCCIÓN

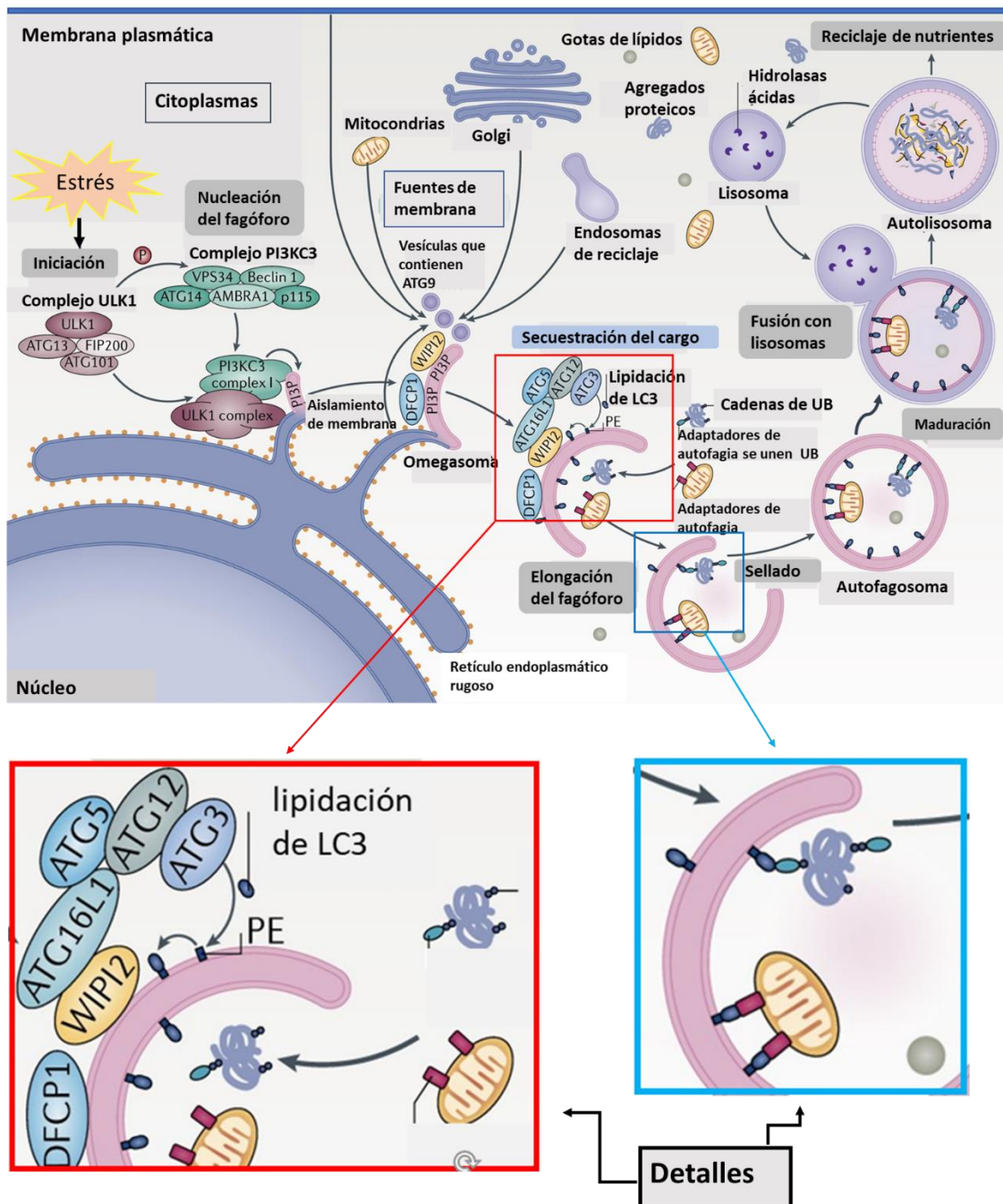


Figura 2. Descripción general del proceso de autofagia. Las señales que activan el proceso autofágico (iniciación) normalmente se originan a partir de diversas condiciones de estrés, como inanición, hipoxia, estrés oxidativo, agregados de proteínas, entre otros. Estas vías de señalización tienen como objetivo la activación del complejo ULK1 para iniciar el proceso de autofagia. El complejo ULK1 recluta y activa al complejo PI3KC3 mediante la fosforilación de sus subunidades. A continuación, el complejo PI3KC3 desencadena la nucleación del fagóforo catalizando la conversión de fosfatidilinositol local en

fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) en una estructura característica del retículo endoplasmático denominada omegasoma. El PI3P generado actúa como una señal para reclutar varias proteínas efectoras, tales como ATGs, WIPIs y DFCP1. Estas proteínas efectoras reclutan el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 que junto las proteínas ATG7 y ATG3 efectúan la conjugación de las proteínas de la familia LC3/GABARAPA a la fosfatidiletanolamina (PE) residente en la membrana del fagóforo, formando así las formas lipidadas unidas a la membrana. En esta reacción de conjugación LC3-I se convierte en PE-LC3-II, la firma característica de las membranas autofágicas. Las proteínas LC3/GABARAP son necesarios para la elongación, maduración y el cierre de la membrana del fagóforo. Además, en la autofagia selectiva, LC3/GABARAP está involucrado de manera crítica en el secuestro del cargo a través de las proteínas adaptadoras de la autofagia que contienen un motivo LIR. Varias membranas de la célula incluido el retículo endoplasmático rugoso, el complejo de Golgi, las mitocondrias y la membrana plasmática contribuyen al alargamiento de la membrana autofagosómica mediante la donación de material de membrana (parte de estas bicapas lipídicas son transportadas por vesículas que contienen ATG9, pero el origen del resto de la bicapa lipídica es actualmente desconocido). El sellado de la membrana autofagosómica da lugar a una vesícula de doble capa lipídica denominada autofagosoma, que madura y finalmente se fusiona con el lisosoma. Los lisosomas contienen hidrolasas ácidas que degradan la carga autofágica hasta convertirla en moléculas esenciales, que luego se liberan de nuevo al citoplasma para que la célula los utilice nuevamente²⁶. (Imagen modificada del Dr. Ivan Dikic)²⁶.

Los miembros de la familia ATG8/LC3 lipidados y localizados en el autofagosoma desempeñan múltiples funciones. Se postula que la subfamilia LC3 media el alargamiento de la membrana del fagóforo, mientras que las proteínas de la subfamilia GABARAP actúan en la etapa posterior, en el sellado del autofagosoma^{107,108}. Por otra parte, las dos subfamilias ATG8/GABARAP son cruciales para la fusión de autofagosomas con los lisosomas^{46,109,50}. Además, la familia ATG8/LC3 juega un papel crucial en la autofagia selectiva al actuar de receptores para las proteínas adaptadoras de autofagia que median el reclutamiento de cargos específicos al autofagosoma^{110,111}.

En consistencia con estas funciones centrales, defectos en el sistema de conjugación de LC3 da como resultado la acumulación de membranas de aislamiento anormales, vesículas preautofagosómicas y autofagosomas incompletos no sellados en células de mamífero¹¹².

1.2.5 Fase 4: Maduración y reciclaje

Durante la formación y la maduración de los autofagosomas, las membranas que los forman adquieren un subconjunto de proteínas GTPasas tales como RAB7, RAB2 y ARL8, entre otras, que les confieren competencia para poder fusionarse con otros orgánulos (endosomas tardíos, lisosomas) a su vez positivos también en GTPasas. Por tanto, las GTPasas actúan como reguladoras esenciales tanto en el tráfico citoplasmático de los autofagosomas como en su fusión con los endosomas tardíos o lisosomas. Este subconjunto de proteínas es capaz de unir GTP e hidrolizarlo a GDP, actuando así como interruptores moleculares¹¹³.

Los autofagosomas se pueden generar en posiciones aleatorias en todo el citoplasma y luego son transportadas hacia el centro de la célula. Por el contrario, los endosomas tardíos y los lisosomas suelen mostrar más bien una distribución perinuclear en la mayoría de los tipos de células y pueden ser transportados hacia la periferia celular¹¹⁴. Ambos tipos de transporte están mediados por la red de los microtúbulos y las proteínas motoras asociadas a los microtúbulos. En este sistema, el complejo motor quinesina situado al extremo negativo de los microtúbulos es capaz de transportar los lisosomas (y otras vesículas) a la periferia celular, mientras que el complejo motor dineína/dinactina situado al extremo positivo microtubular mueve las vesículas (incluidos los autofagosomas) a la región perinuclear¹¹⁵ (Figura 3). Las GTPasas mencionadas anteriormente entran en juego en este sistema funcionando como un enlace entre las membranas vesiculares y las proteínas motoras asociadas al citoesqueleto¹⁹. Entre estas GTPasas cabe destacar las RAB7 y ARL8 porque se unen a varias proteínas adaptadoras de los motores, como FYCO1, ORP1L, RILP, PLEKHM1/2 y BORC^{116,117} (Figura 3).

Los autofagosomas y los lisosomas se mueven a lo largo de los elementos citoesqueléticos. Eventualmente, cuando llegan a su destino, necesitan acoplarse mutuamente para poder fusionarse, y la fusión efectiva está regulada por varios complejos proteicos que incluyen GTPasas Rab, complejos de ligación de membranas de múltiples subunidades (tales como HOPS, EPG-5, TECPR1, GRASP55, BRUCE y RUFY4) y las proteínas SNAREs¹¹⁸ (Figura 3). Los complejos se unen a GTPasas cargadas con GTP en las superficies de las vesículas y también a proteínas de la familia ATG8/LC3 y PI3P autofagosomales. De esta manera, permiten estrechar las bicapas lipídicas enfrentadas, para así entrecruzar las membranas autofagosómicas con las

membranas endosomales o lisosomales. Finalmente, los complejos SNARE (del inglés, *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor*) acaban ejecutando la fusión de autofagosomas con los lisosomas¹¹⁹.

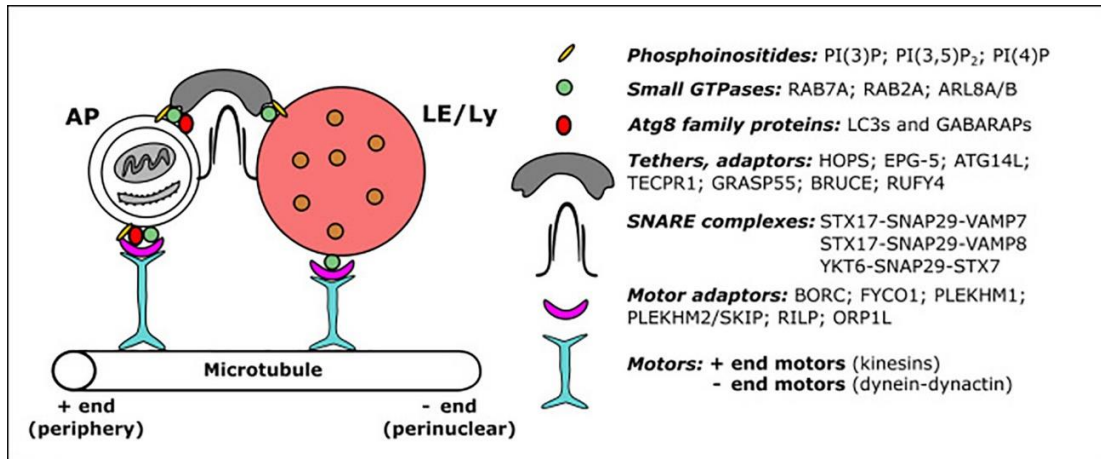


Figura 3. Principales factores implicados en la fusión de autofagosomas con los lisosomas en células humanas. La fusión del autofagosoma (AP) con un endosoma tardío (LE) o lisosoma (Ly) se lleva a cabo mediante proteínas SNARE específicas, GTPasas pequeñas y sus efectores, adaptadores y proteínas motoras, con la ayuda de factores adicionales que se muestran en este modelo. Ver texto principal para más detalles. (Imagen modificada del Dr. Péter Lőrincz)¹⁹.

1.3 Modalidades de la autofagia selectiva

Aunque originalmente se pensaba que la autofagia era un proceso de degradación no selectivo, estudios más recientes han demostrado que la autofagia funciona de forma selectiva en determinadas condiciones^{120,121}. La idea de la degradación selectiva de las proteínas se inició con los primeros descubrimientos del sistema ubiquitina/proteasoma. Se demostró que este sistema solo era capaz de eliminar tan solo un subconjunto de proteínas, las que previamente habían sido etiquetadas con ubiquitina¹²². Posteriormente, Dice, a finales de la década de 1970, empezó a apuntar hacia un cierto nivel de selectividad en los procesos de autofagia, demostrando que los lisosomas degradaban las proteínas a velocidades diferentes y que algunas eran degradadas preferentemente en algunas condiciones particulares como la inanición o la diabetes¹²³.

1 INTRODUCCIÓN

Este concepto de degradación selectiva de las proteínas por los lisosomas fue madurando hasta llegar a la identificación de una de las primeras vías de autofagia selectiva, conocida como autofagia mediada por chaperonas (CMA) (para más información véase el apartado 1.1.2 Características de la autofagia)^{124,125}. La autofagia mediada por chaperona es, en principio, un proceso selectivo en el que solo se degrada los polipéptidos individuales que presentan un motivo KFERQ cuando están desplegados o mal plegados²².

Al contrario que el caso de la CMA, la (macro)autofagia se ha considerado como un proceso poco selectivo, capaz de degradar de forma masiva (“autofagia en masa”) partes del citoplasma tales como macromoléculas y orgánulos¹²⁶ con objeto de reciclar los componentes básicos y ayudar a restaurar el equilibrio energético de las células en condiciones de ayuno¹²⁷. Sin embargo, varios estudios recientes han demostrado y descrito varias formas de autofagia selectiva y que se activa de manera independiente de los niveles de nutrientes. Este proceso de autofagia selectiva consiste básicamente en el reconocimiento de un determinado cargo, por ejemplo, agregados proteicos¹²⁸, orgánulos dañados¹²⁹ o microorganismos invasores¹³⁰, para así llevar a cabo su degradación de manera específica¹³¹. Por lo tanto, ahora se sabe que puede haber una extrema especificidad en la elección del cargo a degradar por el autofagosoma y un intrincado sistema para asignar y capturar dicho cargo¹³²⁻¹³⁷. Esta especificidad y selectividad que tiene el autofagosoma en formación para reclutar un determinado cargo viene determinada por un conjunto de proteínas adaptadoras que se unen por un lado al cargo ubiquitinado y por otra parte a algún receptor de la membrana del autofagosoma, como por ejemplo la familia de ATG8/LC3^{100,138,139} (Figura 4).

La autofagia selectiva se puede clasificar en función de la naturaleza de sus cargos. Así, existen la agrefagia¹³⁴ (degradación de agregados proteicos), mitofagia¹³⁵ (degradación de mitocondrias), pexofagia¹³⁶ (degradación de peroxisomas), lisofagia¹³⁷ (degradación de los lisosomas), reticulofagia¹⁴⁰ (degradación del retículo endoplasmático), ribofagia¹⁴¹ (degradación de los ribosomas), nucleofagia¹⁴² (degradación del núcleo), zimofagia¹⁴³ (degradación de los gránulos secretores) o xenofagia¹⁴⁴ (degradación de los patógenos). Conviene subrayar que estos tipos de la autofagia selectiva comparten (o emplean) la misma maquinaria molecular para formar el autofagosoma que la “autofagia en masa”, pero se diferencian por las moléculas que efectúan el reconocimiento del cargo a degradar¹⁴⁵.

Particularmente, estos procesos de autofagia selectiva pueden ser más cruciales y relevantes en la protección contra la mayoría de las enfermedades de los mamíferos que la “autofagia en masa”, siendo este último principalmente un mecanismo homeostático para contrarrestar el estrés nutricional y energético durante los periodos de ayunos¹⁴⁶.

1.3.1 Las proteínas adaptadoras de la autofagia

En los últimos años, se han logrado avances muy importantes en la comprensión de ciertos aspectos de la autofagia selectiva, en particular descifrar los mecanismos moleculares por el que un determinado cargo se puede unir a la membrana del fagóforo en formación de manera específica. En la mayoría de los casos, el cargo contiene una región identificable que interactúa con LC3 o bien presenta un motivo capaz de unirse directamente a la región LIR (W/F/Y1×2×3L/I/V4) de LC3^{147,148} (Figura 4). Además, hay algunos cargos que son reclutados hacia la membrana del autofagosoma a través de unas proteínas adaptadoras de autofagia. Estos cargos están previamente ubiquitinados para luego unirse a las proteínas adaptadoras que contienen tanto un dominio de unión a ubiquitina como un motivo para interactuar con LIR de LC3 (Figura 4). Básicamente, estas proteínas adaptadoras actúan como un puente entre el cargo y el LC3 (o GABARAP) conjugado en la membrana del fagóforo^{111,120}.

Por lo tanto, la autofagia selectiva se ejecuta a través de un conjunto de proteínas adaptadoras de autofagia y de las proteínas de la familia ATG8/LC3. De estas últimas se han identificado 6 homólogos en mamíferos, en el que se dividen en dos subgrupos: la subfamilia LC3 (del inglés, *light chain 3*) que incluye LC3A, LC3B, LC3C y la subfamilia GABARAP (del inglés, *γ-aminobutyric acid receptor-associated protein*) que incluye GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2/GATE16^{149,150}. Cabe destacar que, LC3B es la proteína más estudiada y mejor caracterizada entre la familia de ATG8/LC3.

Las principales moléculas adaptadoras de autofagia identificadas hasta ahora son TOLLIP, SQSTM1/p62, NDP52, OPTN y NBR1, que presentan una firma molecular WXXL denominada región de interacción con LC3 (LIR)¹⁴⁷ así como dominios de unión a ubiquitina (hasta cuatro tipos diferentes)^{151,152}. Estas proteínas adaptadoras de autofagia son los que reclutan los cargos ubiquitinados destinados a degradar¹⁵³, uniéndose por un lado a LC3 a través de su dominio LIR y por otro a la ubiquitina que marca el cargo para su degradación^{31,154} (Figura 4).

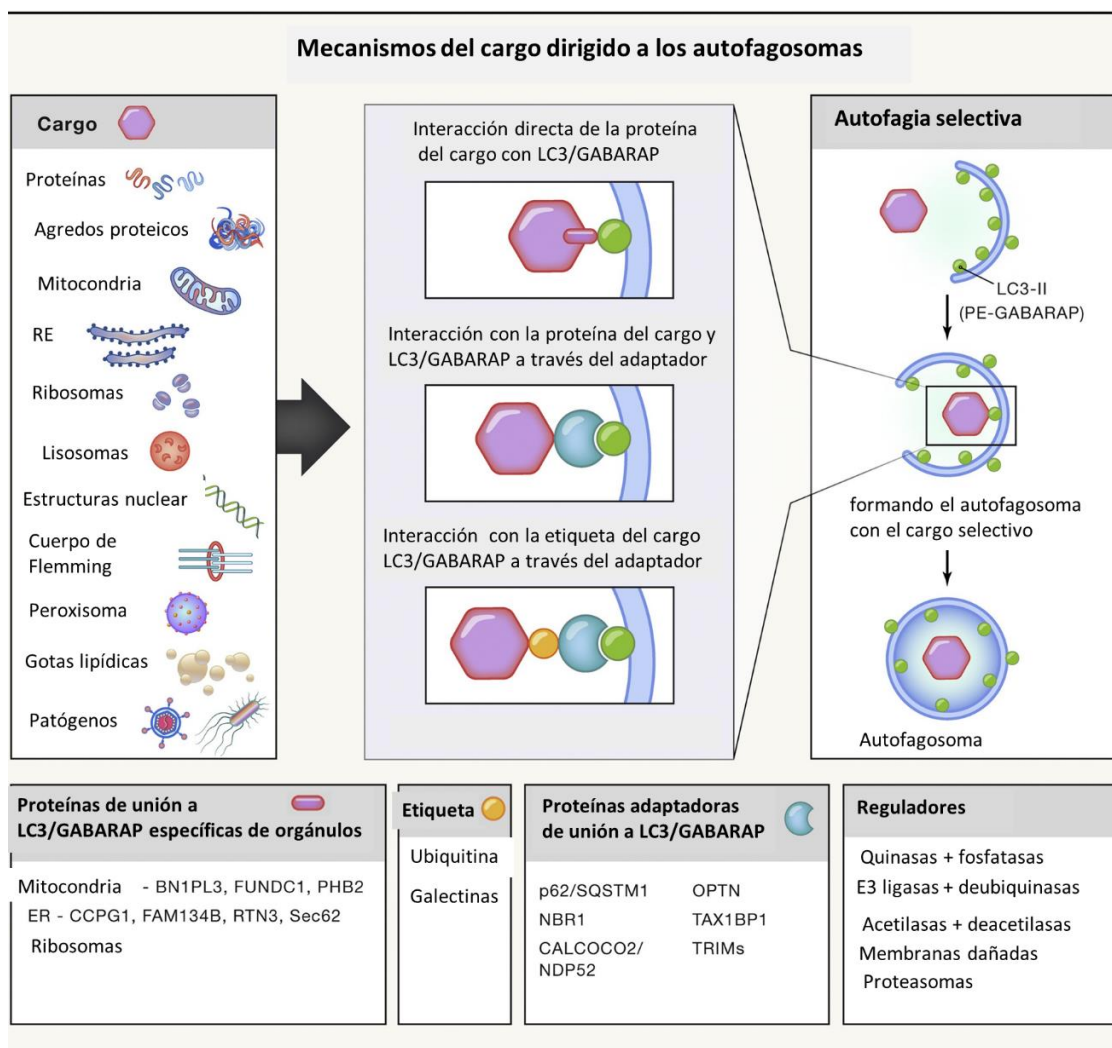


Figura 4. Esquema conceptual de la autofagia selectiva. Este esquema representa a los diferentes cargos que se degradan por la vía de autofagia y los mecanismos moleculares mediante los cuales el cargo se une a los miembros de la familia LC3/GABARAP de la membrana del fagóforo. Además, se enumeran algunas proteínas de unión a LC3/GABARAP específicas de orgánulos, etiquetas que marcan el cargo destinado a la degradación mediante autofagia selectiva, las proteínas adaptadoras de autofagia que se unen a LC3/GABARAP y algunos factores que regulan el reconocimiento del cargo por las proteínas adaptadoras o LC3/GABARAP. Las proteínas de unión a LC3/GABARAP específicas de orgánulos y las proteínas adaptadoras de unión a LC3/GABARAP interactúan con LC3/GABARAP a través de motivos W/F/YxxL/I/V conservados¹⁵. (Imagen modificada de la Dra. Beth Levine)¹⁵

1.3.2 Mitofagia

Las mitocondrias desempeñan múltiples funciones metabólicas importantes en la célula, tales como el suministro de energía a través de la producción de ATP, regulación del estrés, la biosíntesis de fosfolípidos y carbohidratos o almacenamiento de Ca^{2+} , y también influyen en el destino celular al regular la apoptosis y necrosis¹⁵⁵. Las mitocondrias pueden generar especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “reactive oxygen species”) a través de electrones que se escapan de la cadena de transporte de electrones. Estos electrones reaccionan con moléculas que tienen oxígeno en la región circundante de la mitocondria, produciendo así metabolitos de oxígeno parcialmente reducidos con una fuerte capacidad oxidante y extremadamente reactivos, y por ello potencialmente peligrosos para la célula, ya que pueden dañar el ADN o introducir mutaciones. Especialmente, las mitocondrias dañadas generan una excesiva cantidad de ROS¹⁵⁶. Estudios recientes han demostrado que la acumulación de las mitocondrias disfuncionales está relacionada con la tumorigénesis¹⁵⁷.

La mitofagia es un proceso esencial que consiste en la degradación selectiva de las mitocondrias dañadas para evitar su acumulación. Esta eliminación cumple varios roles a nivel intracelular, como la reducción de ROS mitocondrial que puede desencadenar la inflamación y el estrés genotóxico, mantiene el metabolismo celular normal y previene la liberación de factores proapoptóticos mitocondriales¹⁵⁸. Como resultado, la mitofagia contribuye a la supresión de la formación de tumores al eliminar eficazmente las mitocondrias aberrantes. Además, la mitofagia participa en procesos de desarrollo y diferenciación celular de los mamíferos, tales como la eliminación de las mitocondrias paternas del óvulo fertilizado, la eliminación de las mitocondrias durante la maduración de los glóbulos rojos y el cambio de color de marrón a blanco en la diferenciación de los adipocitos^{156,159,160}.

La mitofagia permanece activa constantemente en condiciones basales y se induce en condiciones fisiológicas específicas. Existen tres principales vías selectivas de la mitofagia que son específicas en función de la señalización y del contexto celular. Entre estas vías esta la mitofagia mediada por NIX durante la diferenciación celular¹⁶¹, la mitofagia inducida por hipoxia mediada por FUNDC1¹⁶² y la mitofagia PINK1/PARKIN implicada durante el daño mitocondrial no hipóxico¹⁶³.

1 INTRODUCCIÓN

La vía PINK1/PARKIN es la que regula predominantemente la mitofagia. Esta vía se activa tras la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, que provoca la estabilización de PINK1 en la membrana externa de la mitocondria, la fosforilación y activación de PARKIN y la ubiquitinación PARKIN-dependiente de proteínas mitocondriales que actúa como señal para la captura de las mitocondrias por los autofagosomas, promoviendo su degradación de manera selectiva¹⁶⁴. Mutaciones en PINK1 y PARKIN están asociadas a enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica¹⁶⁵, subrayando la importancia de este mecanismo en patología.

1.3.3 Agrefagia

Las proteínas mal plegadas se producen de manera continua en las células debido a múltiples causas, como la existencia de mutaciones, traducciones incompletas, el plegamiento incorrecto después de la traducción, modificaciones proteicas aberrantes o daño oxidativo^{134,166}. De forma similar, los complejos proteicos mal formados pueden dar como resultado proteínas con una conformación incorrecta¹⁶⁷.

Además, existen múltiples proteínas propensas a formar agregados tales como α -sinucleína (SNCA)¹⁶⁸, β -amiloide¹⁶⁹ y huntingtina (HTT)¹⁷⁰. La acumulación de estos agregados es a menudo dañino e incluso puede ser letal para las células. Se ha comprobado que la formación de agregados proteicos está asociada con varias enfermedades humanas, en particular trastornos neurodegenerativos, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y la enfermedad por priones¹⁷¹⁻¹⁷³.

Las células eucariotas disponen de varios mecanismos para deshacerse de manera selectiva de las proteínas mal plegadas o dañadas y de agregados de proteínas. Entre estos mecanismos están: el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y la macroautofagia^{18,20}. Los sistemas UPS y CMA están limitados a degradar solamente las proteínas solubles y de vida corta, mientras que los agregados más voluminosos solo pueden degradarse mediante un proceso de autofagia selectiva que se conoce como agrefagia¹⁶⁶. El reconocimiento específico viene determinado por adaptadores selectivos que reconocen al cargo ubiquitinado para vincularlo a los autofagosomas. Algunos de estos adaptadores son: p62/SQSTM1, NBR1, OPTN y TOLLIP^{132,174,175}. Todos ellos poseen una o más regiones de

interacción con ubiquitina (UBA) y también son capaces de interactuar con LC3 a través de regiones LIR. El papel propuesto para estos adaptadores en la agregafagia es unir a los miembros de la familia de LC3/GABARAP y a los autofagosomas con los cargos ubiquitinados^{100,176} (Figura 4).

p62, la primera proteína adaptadora de autofagia en ser identificada, se une preferentemente a un determinado enlace de ubiquitina (Lys63) en la superficie de agregados de proteínas para llevarlos a los autofagosomas en formación a través de la interacción de LC3-II (figura 4)¹⁷⁷. p62 es una molécula compleja y multifuncional que además modula la formación de agregados y regula los genes de respuesta al estrés¹⁷⁸.

Otro factor que cabe destacar en este escenario es la proteína de transporte nucleocitoplasmático WDFY3 (también conocida como ALFY). Si bien es cierto que no puede unirse a los cargos ubiquitinados, sí se sabe que interactúa con ATG5, p62/SQSTM1 y miembros de la subfamilia LC3/GABARAP y PI3P, actuando como una molécula de ensamblaje durante la degradación de agregados dependiente de p62/SQSTM1^{179,180}.

1.3.4 Xenofagia

La autofagia de entes extraños, como bacterias, virus y otros patógenos, se denomina xenofagia. Las bacterias y los virus invaden el citoplasma de varios tipos de células para multiplicarse, y la xenofagia juega un papel fundamental en la eliminación especializada de estos patógenos intracelulares. La xenofagia se puede desencadenar por ubiquitinación del agente invasivo después del daño a las membranas de los endosomas efectuado por las bacterias¹⁸¹. Una vez más, la ubiquitinación y la unión cargo-adaptador juegan un papel importante también en el ámbito de la xenofagia. De manera análoga a la agregafagia o mitofagia, la xenofagia emplea las mismas proteínas adaptadoras de autofagia (P62, NDP52, OPTN, TAX1BP1 y NBR1) para reconocer y transferir los cargos de forma selectiva a los autofagosomas a través de LC3^{130,182,183} (Figura 4).

1.3.5 Fagocitosis asociada a LC3 (LAP)

La fagocitosis asociada a LC3 (LAP, por sus siglas en inglés *LC3-associated phagocytosis*), es una forma de autofagia no canónica que está presente en células capaces de realizar

fagocitosis, incluidos los macrófagos, las células epiteliales y las células endoteliales. LAP se induce cuando una partícula extracelular (como un patógeno, una célula muerta o complejos del sistema inmune) es detectada por los receptores tipo Toll (TLRs)^{184,185}. La estimulación de estos receptores desencadena la formación de fagosomas integrando al cargo en su interior¹⁸⁵. Este proceso desencadena una cascada de señalización que culmina en el reclutamiento de algunos miembros de la maquinaria de autofagia canónica para conjugar LC3 a la membrana sencilla del fagosoma, que es completamente diferente de los autofagosomas de doble membrana. En los pasos posteriores, el fagosoma se fusiona con los lisosomas para adquirir capacidad hidrolítica, lo que lleva a la destrucción y reciclaje del material fagocitado¹⁸⁶. Se ha descrito que LAP participa en varias funciones decisivas, como la presentación de antígenos a través del MHC-II (complejo mayor de histocompatibilidad de clase II)¹⁸⁷, o la eliminación eficaz de las células apoptóticas, bacterias, hongos y virus^{186,188,175}.

1.4 Implicación de la autofagia en la salud

La salud de los organismos pluricelulares requiere de una correcta coordinación de varios procesos biológicos entre los que se encuentran la respuesta del sistema inmune, los circuitos metabólicos, la preservación de la integridad genómica y el mantenimiento de la viabilidad celular entre otros. La autofagia juega un papel trascendental en todos estos procesos mediante la regulación de la homeostasis celular^{26,189}.

En este contexto, la autofagia selectiva es la que más fundamentalmente contribuye a mantener la salud de los seres vivos (véase apartado *1.3 Modalidades de la autofagia selectiva*). Prácticamente cualquier parte de la célula puede ser seleccionada por los sistemas de autofagia selectiva para proceder a su degradación lisosomal en caso de que presente alteraciones funcionales o potencial patogénico. De este modo, como ya se ha mencionado, la autofagia puede degradar selectivamente desde proteínas mal plegadas y propensas a formar agregados citoplasmáticos, a orgánulos deteriorados o patógenos intracelulares. La incapacidad de la ruta autofágica para degradar estos componentes y sustituirlos por componentes sanos está asociada a patologías de etiología muy variada, entre las que incluyen enfermedades neurodegenerativas¹⁹⁰, enfermedades infecciosas¹⁹¹, cardiomiopatías¹⁹², diabetes tipo II¹⁹³ y cáncer¹⁹⁴.

1.4.1 Enfermedades neurodegenerativas

Las patologías neurodegenerativas pueden ser esporádicas o hereditarias y están relacionadas con la edad. Se manifiestan mediante la pérdida progresiva de las funciones y muerte de las células neuronales. Las características más comunes de las patologías neurodegenerativas (como puede ser el Alzheimer, Parkinson, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA)), son la presencia de proteínas mal plegadas o desplegadas, la formación de agregados proteicos y la disfunción mitocondrial^{134,135,173,190,195,196}. La acumulación de estos agregados de proteínas en el interior de las células neuronales provoca graves alteraciones en sus funciones e incluso la muerte celular. La eliminación de estos agregados mediante mecanismos activos es particularmente relevante en las neuronas, puesto que, al no dividirse tras la diferenciación, estas células no pueden reducir la presencia de los componentes dañinos a través su redistribución a las células hijas mediante la división celular^{195,197}. En las células sanas, las proteínas inservibles se etiquetan con ubiquitina y son degradadas a través del proteasoma o mediante autofagia selectiva^{166,198}. Pero la actividad del proteasoma es propensa a deteriorarse por diversos tipos de estrés celular y decrece su eficacia con la edad¹⁹⁸, por lo que, en este contexto, el proceso de control de calidad intracelular efectuado por la autofagia es particularmente relevante. En este caso, la autofagia es la vía encargada de llevar a cabo la degradación tanto de las proteínas como de los agregados proteicos indeseados, por medio de las proteínas adaptadoras de autofagia como p62^{110,132} (véase el apartado 1.3.1 *Las proteínas adaptadoras de la autofagia*).

Los ratones con deleciones en genes esenciales de autofagia tales como *Atg5*, *Atg7* o *Beclin-1* fallecen en las etapas de embriogénesis o a pocos días de nacer¹⁹⁹. Sin embargo, los ratones deficientes en estos genes específicamente en los tejidos neuronales consiguen sobrevivir, pero desarrollan déficits progresivos en la función motora, muestran reflejos anómalos y acumulan cuerpos de inclusión positivos para ubiquitina en las neuronas²⁰⁰. Estos estudios demuestran que la autofagia tiene un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis neuronal y la prevención de patologías neurodegenerativas.

Además de los agregados proteicos potencialmente tóxicos, las mitocondrias dañadas es otro factor considerado como una de las principales causas de los trastornos

neurodegenerativos. Las mitocondrias defectuosas elevan los niveles de ROS, causando daños tanto en el proteoma como en el genoma celular, y la mitofagia contribuye a eliminar estos orgánulos disfuncionales de forma específica¹³⁵. La mitofagia está fuertemente regulada por la vía PINK1/PARKIN (véase el apartado 1.3.2 *Mitofagia*), y se sabe que mutaciones en PINK1 y PARKIN se asocian con la aparición de la patología de Parkinson de forma temprana en la vida²⁰¹. Estos estudios subrayan la importancia de la mitofagia en la prevención de las enfermedades neurodegenerativas.

1.4.2 Cáncer

Dado el importante papel que autofagia desempeña en la homeostasis celular, no es de extrañar que también tenga implicaciones importantes en cáncer. Sin embargo, este papel es complejo, y depende de factores biológicos como el tipo de tumor, el oncogén impulsor y los genes supresores de tumores²⁰². El paradigma general es que la autofagia actúa como supresor tumoral en las fases tempranas del proceso, pero favorece la supervivencia de la célula tumoral en etapas tardías, ayudándola a sobrevivir en un ambiente hostil y cambiante.

Por un lado, la pérdida de la autofagia se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer²⁰³. Por ejemplo, una de las alteraciones genéticas más frecuentes en los cánceres esporádicos de mama, ovario y próstata en humanos es la pérdida monoalélica del gen esencial *beclin-1/BCN1*, que además se asocia a cánceres más agresivos y de peor pronóstico^{189,204,205}. De manera similar, en modelos de ratones modificados genéticamente, la delección parcial o completa de genes esenciales para la autofagia, como *Ambra1^{+/-}*, *Atg4c^{-/-}* y *Atg5^{-/-}*, se asocian con una mayor incidencia de tumores espontáneos²⁰⁶.

Por otro lado, también se ha demostrado que la autofagia puede ayudar a las células malignas a evadir el estrés genotóxico, la hipoxia asociada al nicho tumoral y los procesos de inflamación desencadenados por el sistema inmune, promoviendo así el proceso tumorigénico. Por lo tanto, la autofagia es capaz de proporcionar plasticidad metabólica a las células cancerosas para subsistir en microambientes hostiles y subóptimos²⁰⁷. Además, existe evidencia de que la autofagia fomenta la supervivencia de las células tumorales durante el estrés inducido por las terapias (quimioterapia, radioterapia y fármacos), generando así resistencia terapéutica^{208,209}. De hecho, muchos tipos de cánceres en etapas avanzadas

exhiben de una autofagia basal elevada, sugiriendo que un mayor nivel de autofagia aporta una ventaja selectiva a la célula transformada²¹⁰. Así, se ha visto que algunos tipos de tumores son fuertemente dependientes de la autofagia, entre los que se incluyen el cáncer de páncreas²¹¹ y cánceres con mutaciones en los genes *HRAS* y *KRAS*²¹².

En consistencia con el papel dual de la autofagia en cáncer, se ha observado que ratones con adenocarcinoma pancreático ductal p53-positivo la ausencia de autofagia previene la formación de neoplasias intraepiteliales pancreáticas. Por el contrario, la inhibición de la autofagia en ausencia del p53 favorece el crecimiento del mismo tipo tumoral, indicando la importancia del contexto genético a la hora de determinar el impacto de la autofagia en la biología del tumor²¹³.

1.4.3 Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn (EC) es una enfermedad genética compleja y multifactorial. Puede afectar a cualquier tramo del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano. Principalmente conlleva a la inflamación de partes discontinuas del intestino delgado y el colon^{214,215}. Los síntomas más frecuentes de la EC son el dolor abdominal, sangrado rectal, diarrea y pérdida de peso. Inicialmente la patología transcurre con periodos de actividad y remisión. Generalmente, suele evolucionar hacia un estado crónico y en ciertas ocasiones provoca complicaciones graves que pueden requerir cirugía resectiva, afectando gravemente a la calidad de vida de los pacientes tanto a nivel físico como mental²¹⁶.

La etiología de la EC es desconocida y su patogénesis no está bien establecida, y este desconocimiento mecanístico explica por qué aún no se dispone de una terapia verdaderamente curativa que esté dirigida hacia las causas primarias de la enfermedad. Se postula que la patología es consecuencia de alteraciones de la homeostasis del sistema inmune de la mucosa intestinal causadas por la influencia de ciertos factores ambientales en sujetos genéticamente predispuestos²¹⁷. De hecho, el epitelio intestinal establece una importante barrera de protección impidiendo el paso de sustancias potencialmente nocivas, en la que tienen papeles muy relevantes las células caliciformes (Goblet) y las células de Paneth. Las células caliciformes son productoras de una gruesa capa de moco intestinal, cuyo espesor mantiene alejados a los microorganismos, mientras que las células de Paneth

segregan péptidos antimicrobianos que confieren mayor capacidad defensiva a la mucosa intestinal. Además, las células epiteliales intestinales utilizan la autofagia para eliminar a los patógenos invasores, en un proceso especializado denominado xenofagia (véase apartado 1.5 *Xenofagia*). La función xenofágica defectuosa de estas células epiteliales contribuye al fenotipo de la EC^{218,219}.

En las últimas décadas, numerosos estudios de asociación genética han contribuido a la identificación de moléculas involucrados en el inicio y desarrollo de la EC. En dichos estudios, han identificado polimorfismos de riesgo que corresponde a moléculas que median la inmunidad innata y la autofagia, como son NOD2, IRGM, STAT3, JAK2, IL23R y ATG16L1 entre otros²²⁰. NOD2 desempeña un papel crucial en el reclutamiento de ATG16L a la membrana plasmática durante la invasión bacteriana. Mutaciones en el receptor NOD2 implicado en el sistema inmune innato lleva a la incapacidad de reconocer a los microorganismos intracelulares, causando deterioro en la inducción de la autofagia, la presentación de antígenos, el tráfico bacteriano y una defensa deficiente contra la infección bacteriana²²¹. Estos defectos se asocian a la inducción de reacciones inflamatorias persistentes en respuesta a la infección bacteriana.

Por otro lado, el polimorfismo T300A, localizado en el dominio WD40 de la molécula autofágica ATG16L1, también se asocia a un mayor riesgo de sufrir la EC²²². La presencia de este polimorfismo parece alterar las actividades de autofagia no convencional llevadas a cabo por esta región de ATG16L1, afectando al proceso de eliminación de patógenos intracelulares o xenofagia mediado por esta molécula²²³. En nuestro laboratorio se ha descrito que un nuevo proceso de autofagia atípica mediado por la molécula transmembrana TMEM59²²⁴ se ve alterado en presencia del alelo de riesgo de T300A, dificultando así la defensa xenofágica contra la infección bacteriana²²⁵.

1.5 Xenofagia

El cuerpo humano está compuesto aproximadamente por 3×10^{13} de células, pero también hospeda alrededor de 4×10^{14} bacterias. Las bacterias que cohabitan en el organismo son beneficiosas para diversas funciones biológicas, desde ayudar a digerir los alimentos hasta producir vitaminas²²⁶. En cambio, los microorganismos infecciosos pueden ser nocivos y

causar patologías potencialmente mortales, por lo que resulta estrictamente necesario eliminarlos de manera selectiva y eficiente. Para lograr este objetivo, las células de los mamíferos han desarrollado varios mecanismos de defensa para detectar y destruir los patógenos que puedan resultar perjudiciales. Entre estos mecanismos cabe destacar la autofagia antimicrobiana (en lo sucesivo, xenofagia), por ser una forma selectiva de autofagia que es capaz de degradar a los patógenos bacterianos y virales intracelulares²²⁷⁻²³⁰.

1.5.1 Definición de la xenofagia

La xenofagia es un mecanismo evolutivamente conservado que consiste en combatir y eliminar patógenos después de la invasión celular. En este contexto, la autofagia actúa como un mecanismo inmunológico innato frente a la infección bacteriana intracelular. Aunque la xenofagia tradicionalmente se asocia a la invasión de patógenos biológicos, en realidad el término "xeno-" se refiere a cualquier objeto extraño, incluidos los metales²³¹.

La xenofagia es un fenómeno que se empezó a describir relativamente reciente. Aunque el término xenofagia fue acuñado por primera vez en la década de 1980 en la literatura²³², los estudios de señalización y caracterización de los mecanismos moleculares implicados se iniciaron a principios del siglo XXI²³³. Por tanto, la xenofagia es todavía un campo nuevo de estudio y aún queda mucho por explorar para comprender completamente las señalizaciones y las vías moleculares que regulan este fenómeno.

1.5.2 Diferentes tipos de xenofagia

Existen diferentes procesos a través de los cuales la maquinaria autofágica induce xenofagia. Por un lado, la autofagia canónica (descrita en el apartado 1.2 La maquinaria molecular de la autofagia y sus mecanismos) puede secuestrar en autofagosomas clásicos de doble membrana, y posteriormente digerir, tanto patógenos citosólicos como aquellos que se encuentran dentro de fagosomas convencionales²²⁷ (Figura 5). Por otro lado, la maquinaria autofágica es capaz de funcionar de formas no canónicas para desempeñar funciones en la defensa celular, por ejemplo, promoviendo el marcaje de fagosomas convencionales de membrana sencilla con ATG8/LC3 para favorecer su fusión con el compartimento lisosomal^{234,235} (un proceso conocido como LAP, ver más arriba). Todos estos procesos

vinculados a la xenofagia constituyen una red redundante de defensa con diferentes capas de regulación que frecuentemente se activan simultáneamente y tienen un efecto sinérgico en la defensa contra agentes invasivos (Figura 5). Por ejemplo, en algunos casos las bacterias consiguen escapar de las vacuolas fagocíticas secretando toxinas efectoras que dañan la membrana fagosomal con la intención de eludir los mecanismos xenofágicos vacuolares y acceder directamente al citosol donde intentan proliferar. Pero en este compartimento también son reconocidas como agentes no deseados y etiquetadas con ubiquitina para ser posteriormente redirigidas hacia autofagosomas convencionales a través de proteínas adaptadoras (Figura 5). Por tanto, múltiples niveles de regulación hacen de la xenofagia un robusto sistema de defensa contra las infecciones intracelulares²²⁷.

De forma interesante, las bacterias también han desarrollado mecanismos de defensa para adaptarse al medio hostil de las células y contrarrestar la respuesta xenofágica²³⁶. Las bacterias disponen de un variado arsenal de proteínas efectoras y toxinas que liberan en el medio intra o extracelular con el fin de sortear la autofagia, por ejemplo bloqueando las vías de señalización que conducen a la inducción de la autofagia²³⁷, evitando los mecanismos de vigilancia celular, enmascarándose con proteínas del huésped para evitar el reconocimiento de la autofagia²³⁸, bloqueando la maquinaria de la autofagia al desacoplar directamente la conjugación LC3-PE, deteriorando la formación de fagóforos²³⁹ o inhibiendo el proceso de fusión del autofagosoma con los lisosomas²⁴⁰. Algunas bacterias incluso explotan activamente la maquinaria de la autofagia a su favor para promover su propia replicación y crecimiento intracelular, a veces incluso dentro de los propios autofagosomas²⁴¹.

1.5.3 Detección de los patógenos en fagosomas por parte del sistema inmune innato

La inmunidad innata es un sistema de autodefensa fundamental y crítico de las células eucariotas. El sistema inmune innato detecta a los patógenos a través de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés *pathogen-associated molecular pattern*), tales como el lipopolisacárido (LPS), flagelina, peptidoglicano, muramil dipéptido y oligodesoxinucleótido CpG, moléculas que están representadas exclusivamente en los patógenos. Los componentes celulares del sistema inmunológico innato (macrófagos y otras

células inmunitarias) disponen de receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés *pattern recognition receptors*) para detectar y reconocer a los PAMPs^{242,243}. Algunos de estos PRRs están situados en la parte extracelular de la membrana plasmática tales como los receptores de tipo Toll (TLRs, por sus siglas en inglés *Toll-like receptors*), receptores de scavenger y lectinas de tipo C, mientras que los receptores de tipo NOD (NLRs, por sus siglas en inglés *Nod-like receptors*) o las proteínas de reconocimiento de peptidoglicano (PGRP, por sus siglas en inglés *Peptidoglycan recognition proteins*) están localizados en la parte intracelular. En condiciones normales, la estimulación de estos PRR por parte de los PAMPs inician cascadas de señalización que activan diferentes respuestas celulares defensivas, incluyendo la inducción de la formación de autofagosomas, la producción de interferón (IFN), la síntesis de citoquinas proinflamatorias, o la activación de la respuesta inmune adaptativa²⁴³⁻²⁴⁵. Además, los PRRs son capaces de inducir *LC3-associated phagocytosis* (LAP). Así, los patógenos frecuentemente entran en la célula por fagocitosis y se localizan en un compartimento de membrana simple denominado fagosoma, que normalmente madura para entregar su carga bacteriana a los lisosomas para su eliminación^{240,246} (Figura 5). En este contexto, la estimulación de PRRs como, por ejemplo, los NLRs o los TLRs, pueden reclutar parte de la maquinaria autofágica como el complejo PI3KC3, el complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 y ATG7, pero no otras ATGs que actúan más arriba en la cascada señalizadora (como por ejemplo el complejo ULK1), para efectuar la conjugación de LC3 a la membrana del fagosoma. RUBICON juega un papel fundamental en este proceso al promover la asociación del complejo PI3KC3 a la membrana fagosomal para producir PI3P. En esta etapa, el PI3P sintetizado servirá para reclutar al complejo NOX2 NADPH oxidasa (complejo NOX2), donde también interviene RUBICON para estabilizar a este complejo y así producir ROS de manera más eficiente²³⁵. El complejo NOX2 se activa y se ensambla en la membrana del fagosoma durante la fagocitosis de los microorganismos y genera ROS en el lumen de los fagosomas para degradarlos directamente²⁴⁷ (Figura 5). Pero la producción de ROS también desencadena la conjugación de LC3/GABARAP al fagosoma a través de un mecanismo todavía desconocido²³⁵. En este proceso, tanto el complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 como ATG7 y ATG3 son necesarios para la conjugación de LC3 al fagosoma²⁴⁸, que a su vez promueve la degradación del contenido bacteriano al mejorar la fusión de los fagosomas con los lisosomas^{249,186} (Figura 5).

1.5.4 Detección de los patógenos en el citoplasma por parte de la maquinaria xenofágica

Una gran variedad de bacterias patogénicas tienen la capacidad de provocar la ruptura del fagosoma en el que se internalizan a la célula con la intención de proliferar en el citoplasma. La rotura de la membrana del fagosoma expone a la bacteria al citosol de la célula, pero también se exponen los glicanos de membrana y otras moléculas que normalmente están ocultas dentro del fagosoma. Las células de mamífero monitorizan continuamente la integridad de las membranas de fagosomas, siendo este un paso crítico para la detección de patógenos por el sistema inmune innato. Cuando los fagosomas se rompen, los glicanos de la membrana celular son inmediatamente reconocidos por las galectinas, proteínas citoplasmáticas con alta afinidad por glúcidos complejos. A pesar de que las células eucariotas codifican para unas docenas de galectinas, sólo las galectinas 1,3,8 y 9 pueden efectuar el reconocimiento de las vesículas dañadas que contienen patógenos. Por ejemplo, la acumulación de galectina 8 alrededor de las vesículas dañadas actúa como una señal inicial e interactúa con NDP52^{250,251} para provocar su degradación autofágica selectiva (Figura 5). Este mecanismo es notablemente versátil, ya que permite a las células detectar la entrada de patógenos evolutivamente distantes, incluidas bacterias gram-negativas y gram-positivas, así como virus carentes de envuelta lipídica²⁵².

Por otra parte, los patógenos que logran escapar del fagosoma también son diana de un proceso de autofagia selectiva para promover su degradación. Una vez los patógenos son expuestos al citosol, son etiquetados rápidamente con cadenas de ubiquitina^{253,181} que actúan como una segunda señal para autofagia selectiva. Estas señales son reconocidas por las proteínas adaptadoras de xenofagia (tales como p62/SQSTM1, OPTN, CALCOCO2/NDP52 y TAX1BP1), que a su vez interactúan con LC3/GABARAP para dirigir las hacia los autofagosomas y eventualmente entregarlas a los lisosomas para su eliminación^{254,138,255}, tal como se detalla en el apartado 1.3.1 Las proteínas adaptadoras de la autofagia (Figura 5).

fagosomas/endosomas dañadas por los patógenos exponen a moléculas de la cara interna de las vesículas tales como los β -galactósidos y son inmediatamente reconocidos por parte de las galectinas. Las proteínas p62 y TRIM se unen a las galectinas y a su vez reclutan a miembros de la maquinaria autofágica tales como ULK1, Beclin-1 (BECN1) y ATG16L1 para formar autofagosomas y captar tanto a las membranas de vesículas dañadas como a los patógenos en su interior. En cuanto a la parte de la derecha de la imagen, los receptores de reconocimiento de patógenos como TLRs y NOD2 pueden activarse al detectar a los patógenos y reclutar parcialmente los componentes de la maquinaria de autofagia. Por ejemplo, los receptores TLRs desencadenan la fagocitosis asociada a LC3 (LAP). Una vez iniciado este proceso, RUBICON recluta y se une al complejo PI3KC3 para catalizar la conversión del fosfatidilinositol de la membrana de fagosomas en fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P). RUBICON y PI3P también promueven la producción de ROS generado por el complejo NOX2. La producción de ROS desencadena la conjugación de LC3 a la membrana fagosomal a través de un mecanismo desconocido. El propósito final de estas tres vías descritas es entregar los patógenos a los lisosomas para llevar a cabo su degradación²³⁴. (Imagen modificada del Dr. Gabriel Mitchell)²³⁴

1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores

Con frecuencia las bacterias se internalizan a través de la endocitosis/fagocitosis y posteriormente dañan las membranas de los endosomas/fagosomas para escapar al citosol. Una estrategia común utilizada por varios patógenos para esquivar la xenofagia una vez están libres en el citoplasma es camuflarse adhiriendo moléculas del huésped a la superficie bacteriana, para evitar ser reconocidas por los sistemas de detección descritos en los apartados anteriores. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* es internalizada mediante fagocitosis y posteriormente daña la membrana de los fagosomas mediante la secreción de la toxina LLO (del inglés, *listeriolysin O*), una citolisina formadora de poros dependiente de colesterol para escaparse al citosol y poder replicarse de manera más eficiente²⁵⁶. Una vez accede al citosol, *Listeria* evita la xenofagia decorando su superficie con la proteína MVP (del inglés, *Major Vault Protein*) a través de la actividad del factor InlK. De esta manera evita ser ubiquitinada y reconocida por las proteínas adaptadoras de xenofagia²⁵⁷.

Otros estudios indican que *Listeria monocytogenes* expresa ActA, una proteína de la superficie bacteriana que recluta el complejo ARP2/3 (*actin-related protein 2/3*) y proteínas Ena-VASP del hospedador con la finalidad de enmascararse polimerizando actina en la superficie bacteriana. De esta manera evita de ser blanco de ubiquitina y ser dirigida a la

maquinaria de autofagia²⁵⁸. También la polimerización de la actina permite a las bacterias moverse dentro del citoplasma de las células del hospedador y propagarse de una célula a otra²⁵⁹. Específicamente, en ensayos de infección celular se ha descrito que más de 60 % de las bacterias mutantes Δ actA2 colocalizan con LC3 a las 2 horas y 4 horas tras la infección, mientras que en el caso de *Listeria monocytogenes* silvestre solo un ~5 % son positivas para LC3²⁶⁰.

Shigella flexneri emplea una estrategia similar al secretar el efector IcsB bacteriano a través del T3SS para unirse a la proteína IcsA (también conocido como VirG) de su propia superficie. Se ha reportado que IcsA es reconocida por ATG5 para inducir autofagia, por lo que IcsB impide que IcsA pueda ser reconocido por ATG5 y el adaptador NDP52 para llevar a cabo el reclutamiento de *S. flexneri* por la maquinaria autofágica^{261,262}. Según otro estudio, el mecanismo de escape empleado por *S. flexneri* involucra a IcsA/VirG para activar el complejo de proteínas relacionadas con el complejo (Arp) 2/3, a través del reclutamiento y activación de N-WASP, e inducir la polimerización de actina y la motilidad bacteriana dentro del citoplasma celular²⁶³. En particular, en ensayos de infección celular con bacterias mutantes Δ icsB se observó que aproximadamente un 35 % de las bacterias son dirigidas a los autofagosomas a las 2 horas de infección, y en torno a un 50 % a las 6 horas. En cambio, solo un 10 % de bacterias *S. flexneri* silvestres son dirigidas hacia los autofagosomas en las mismas condiciones²⁶¹.

A pesar de que las estrategias de enmascaramiento resulten efectivas para la supervivencia bacteriana evitando la xenofagia, las bacterias utilizan estrategias adicionales para interferir con la xenofagia a distintos niveles. Algunas bacterias han desarrollado habilidades para manipular y utilizar activamente la autofagia para su propio crecimiento intracelular. Incluso hay bacterias que inducen la autofagia, pero al mismo tiempo bloquean la fusión del autofagosoma con el lisosoma para luego utilizar el autofagosoma como un nicho replicativo. Estas bacterias muestran una replicación defectuosa en células deficientes en autofagia. Un ejemplo de estas estrategias es *S. aureus*. Después de la replicación dependiente de autofagia, esta bacteria puede escapar al citosol y causar la muerte celular en un proceso que requiere ATG5 y el locus *Agr* (del inglés, *accessory gene regulatory*) de la bacteria^{264,265}.

Otra estrategia que ponen en marcha los patógenos es interferir con los componentes de la maquinaria autofágica para evitar la maduración de los autofagosomas. De esta manera aumentan sus posibilidades de supervivencia y replicación. En este contexto, *L. monocytogenes*, aparte de su estrategia para camuflarse de los sistemas de ubiquitinación, secreta dos fosfolipasas C bacterianas (PlcA y PlcB) que interfieren con la autofagia al reducir los niveles intracelulares de fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P), una molécula de señalización necesaria tanto para los procesos macroautofágicos como para el proceso de LAP^{266,267}. PlcA/B también cooperan con LLO para mediar en la ruptura óptima de la membrana de los fagosomas y poder escapar al citosol celular²⁶⁶.

Streptococcus pyogenes (también conocido como *Streptococcus* del grupo A, GAS) puede escapar de los fagosomas al citoplasma en un proceso que está mediado por la toxina SLO (del inglés, *streptolisina O*), miembro de una familia de citolisinas formadoras de poros dependientes del colesterol^{268,269}. Por otro lado, *S. pyogenes* secreta una segunda toxina (la cisteína proteasa SpeB) que se dirige directamente a las proteínas adaptadoras de autofagia del huésped, tales como NDP62, p62/SQSTM1 y NBR1, para llevar a cabo su degradación y evitar la autofagia selectiva. De esta manera la bacteria mejora sus posibilidades de sobrevivir y replicarse activamente en el citosol del huésped²⁷⁰.

De manera similar, *S. flexneri* expresa VirA a través el sistema de secreción T3SS al citoplasma. La proteína VirA tiene un dominio que activa las GTPasas para inhibir a RAB1. La actividad de RAB1 es esencial para la nucleación y elongación del fagoforo²⁷¹. Por último, *S. typhimurium* libera una proteína efectora SpvB cuya actividad es despolimerizar la actina, inhibiendo así la formación de autofagosomas²⁷².

1.6 TMEM59

TMEM59 es una proteína transmembrana de tipo I glicosilada (también conocida como factor de células dendríticas 1 (DCF1)) que se expresa de forma ubicua en el organismo de los mamíferos. Es una proteína que consta de 323 aminoácidos, incluida una secuencia señal N-terminal, una región transmembrana, y el extremo C-terminal orientado al citosol. TMEM59 se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas que colocalizan fuertemente con LAMP2 y

CD63, sugiriendo que TMEM59 es una proteína que se localiza principalmente en las membranas de los endosomas tardíos o lisosomas²²⁴.

Originalmente se identificó a TMEM59 como una proteína altamente expresada en las células madre neurales^{273,274}. Trabajos más recientes sugieren que TMEM59 desempeña un papel importante en varios procesos celulares, incluida la regulación de: la proliferación y diferenciación de células madre neurales^{275,276}, la expresión del neuropéptido Y (NPY) y el mantenimiento del equilibrio energético²⁷⁷, en el desarrollo de la columna de las células dendríticas, la apoptosis de células de glioma, la señalización Wnt mediante la interacción con el receptor Wnt Frizzled (FZD), el desarrollo del sistema nervioso²⁷⁸, la activación de la microglía durante la neuroinflamación, la glicosilación y procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP, del inglés *amyloid precursor protein*)²⁷⁹. Además, un trabajo reciente ha demostrado que la reducción de la expresión de TMEM59 promueve la síntesis de factores antiinflamatorios y alivia la neuroinflamación inducida por tratamientos con lipopolisacárido (LPS)²⁸⁰.

1.6.1 Papel de TMEM59 en distintos procesos fisiopatológicos

El glioblastoma es uno de los tumores cerebrales más agresivos en los seres humanos y tiene mal pronóstico, con una mediana de supervivencia de aproximadamente 14 meses. Es muy difícil de tratar debido a la resistencia de las células tumorales a las terapias convencionales^{281,282}. Estudios recientes indican que la sobreexpresión de TMEM59 promueve la apoptosis al causar disfunción de las mitocondrias celulares²⁸³. Además, recientemente se ha demostrado que TMEM59 ejerce efectos de supresión tumoral en las células de neuroblastoma inhibiendo la vía de señalización ERK1/2 para promover la apoptosis²⁸⁴.

La enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés *Alzheimer's disease*) es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad. Se caracteriza por la acumulación anormal de varios péptidos β -amiloides ($A\beta$, del inglés *amiloide- β*) derivados de la APP (del inglés, *amyloid precursor protein*), formación de ovillos neurofibrilares que contienen tau hiperfosforilada, disfunción sináptica, neuroinflamación, muerte neuronal y deterioro cognitivo. En la actualidad no existen terapias efectivas para curar esta enfermedad devastadora. Varios estudios han relacionado a TMEM59 con la enfermedad de Alzheimer²⁸⁵⁻²⁸⁷. Un estudio indica

que la sobreexpresión de TMEM59 modula la N y O-glicosilación compleja de APP induciendo la retención de APP en el aparato de Golgi. De esta manera, se inhibe la escisión de APP por parte de las enzimas α y la β -secretasa tanto en la membrana plasmática como en los endosomas, lo cual resulta en una producción reducida de $A\beta^{288}$. Estudios similares en *Drosophila* indican que la sobreexpresión de TMEM59 reduce la escisión del fragmento APP C99 por la γ -secretasa y mejora el aprendizaje y la memoria de las moscas.²⁸⁹ Otros trabajos describen que la delección de TMEM59 fomenta la activación de las células microgliales²⁹⁰, o que TREM2 interacciona con TMEM59 reduciendo su expresión y promoviendo la supervivencia, proliferación, migración y fagocitosis de las células microgliales²⁹¹. Ensayos de microarrays revelaron que la expresión del gen TMEM59 era mayor en pacientes con AD²⁹², aunque un posible papel de TMEM59 en AD no se ha establecido todavía.

1.6.2 Trabajo previo del laboratorio

TMEM59 fue originalmente identificada en el laboratorio en un cribado de alto rendimiento para identificar proteínas humanas cuya sobreexpresión induce muerte celular atípica, con morfología no apoptótica²⁹³. Estudios posteriores indicaron que TMEM59 contiene un dominio mínimo de 19 aminoácidos en su región intracelular (residuos 263–281) que resulta suficiente para inducir un tipo de autofagia atípica. Este motivo de TMEM59 se une al dominio WD40 de ATG16L1 para promover el marcaje con LC3 de los mismos endosomas de membrana sencilla en los que se localiza esta molécula. Este evento facilita tanto el tráfico vesicular de TMEM59 como la fusión de sus endosomas con el compartimento lisosomal. Con objeto de caracterizar funcionalmente el subdominio activo 263-281, se mutaron individualmente a todos los aminoácidos incluidos en él a alanina y se evaluó la capacidad de todas las mutaciones para inducir la lipidación de LC3. Solo cuatro mutaciones resultaron ser inactivas: Y268A, E272A, Y277 y L280A, disminuyendo la capacidad de generar LC3-II. Además, la introducción simultánea de estos 4 cambios es capaz de bloquear completamente la interacción de TMEM59 con el dominio WD40 de ATG16L1, indicando que efectivamente la actividad autofágica de TMEM59 se produce a través de ATG16L1²²⁴.

Estudios funcionales indicaron que TMEM59 endógeno media la respuesta autofágica inducida por *Staphylococcus aureus*, una actividad que resulta en el marcaje de los fagosomas

de membrana sencilla con LC3 y menor supervivencia de la bacteria. Estos resultados indican que TMEM59 juega un papel relevante en la respuesta celular xenofágica contra microorganismos invasores. De forma muy interesante, este fenómeno de autofagia inducida por TMEM59 se ve alterado en presencia del alelo de riesgo ATG16L1-T300A un polimorfismo codificante que incrementa el riesgo de sufrir la enfermedad de Crohn (ver más arriba), sugiriendo que al menos parte de los efectos deletéreos de este alelo se deben a alteraciones en la función de TMEM59²²⁵.

Datos de otros grupos indican que *Chlamydia trachomatis* es capaz de inhibir la autofagia inducida por TMEM59. Chlamydia libera una proteína efectora CT622/TaiP que interactúa con el dominio WD40 de ATG16L1, bloqueando así el tráfico vesicular y la función normal de TMEM59²⁹⁴.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Debido a la importancia que la xenofagia presenta en la inmunidad innata contra múltiples infecciones bacterianas intracelulares, y teniendo en cuenta resultados previos demostrando que TMEM59 participa en la respuesta xenofágica contra *S. aureus*, la hipótesis de este trabajo es que TMEM59 tiene un papel defensivo más amplio contra diferentes estirpes bacterianas y posiblemente también contra la flora bacteriana intestinal.

El **Objetivo General** de esta tesis es estudiar la función fisiológica de TMEM59 a nivel de organismo mediante la generación de un ratón deficiente en esta molécula, con particular interés en evaluar su posible papel en la defensa intracelular contra infecciones bacterianas.

Los Objetivos Específicos son:

1. Generación de un ratón deficiente en TMEM59 mediante la técnica CRISPR/Cas9.
2. Estudio del ratón deficiente en TMEM59 para explorar la aparición de patologías espontáneas.
3. Generación de líneas de fibroblastos de ratón deficientes en TMEM59 para estudiar *in vitro* la función xenofágica de esta molécula en respuesta a las infecciones bacterianas intracelulares.
4. Ensayos de infección bacteriana *in vivo* en los ratones deficientes en TMEM59 para evaluar el papel de esta molécula en la defensa innata contra las infecciones bacterianas.

MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Modelo Animal

3.1.1 Manejo y manipulación de animales

La estirpe de ratón utilizada en los experimentos de esta tesis es C57BL/6, que procede de los Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EE. UU.). Los ratones fueron mantenidas en el animalario del CIC (CSIC) bajo las normas internacionales GLP (*Good Laboratory Practices*) y los acuerdos del Consejo de Europa sobre experimentación animal aplicada, recogidos en las Directivas 86/609/CEE y la 2010/63/UE y regulados en España por el Real Decreto 53/2013. Además, todos los experimentos y procedimientos que impliquen el uso de animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Universidad de Salamanca.

3.1.2 Generación de un ratón deficiente en TMEM59 mediante la tecnología CRISPR/Cas9

Para obtener el ratón deficiente de TMEM59 mediante la técnica de CRISPR/Cas9 se utilizó una metodología previamente descrita²⁹⁵. En primer lugar, se eligió una guía adecuada utilizando el servidor del laboratorio del Dr. Fen Zhang (Massachusetts Institute of Technology, MIT, <https://zlab.bio/guide-design-resources>). La guía que se seleccionó sobre la base de su composición, actividad teórica y bajo nivel de dianas off-target fue: 5' GCTGCTGTGACTATGGCGC 3', localizada entre las posiciones 57-76 de la región codificante del exón 1 de *Tmem59*. Para generar la sgRNA se diseñaron dos oligonucleótidos sintéticos con la siguiente estructura:

- El oligo *reverse* (sgRNA-Tmem59-Exon1-57-rev):

```
AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTT  
CTAGCTCTAAAAC
```

Aunque se llamó como tal, este oligo *reverse* no presenta ninguna secuencia específica de *Tmem59*, solo contiene la parte estructural de la guía.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

- El oligo *forward* (sgRNA-Tmem59-Exon1-57-fw) está constituido por 3 partes:

TAATACGACTCACTATAGG GCTGCTGTTGACTATGGCGC GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

La parte de la izquierda es el promotor de la polimerasa T7, la zona central es la guía de 20 nucleótidos que pertenecen a la parte específica de Tmem59 (posiciones 57-76 en la región codificante del exón 1) y la parte de la derecha forma parte de la sgRNA y es complementaria al oligo *reverse*. De este modo, al amplificar mediante PCR estos dos oligonucleótidos en ausencia de un DNA molde, se produce un DNA de doble cadena que contiene el promotor de la polimerasa de T7 dirigiendo la transcripción de las sgRNA específica contra el exón 1 de *Tmem59*, así como las regiones estructurales reconocidas por la Cas9. Esta construcción fue purificada mediante el kit de DNA PCR QIAquick (Qiagen, 28104) y se utilizó para transcribir *in vitro* la sgRNA utilizando el kit MEGAshortscript T7 kit (Invitrogen, AM1354). Tras la digestión del DNA molde mediante tratamiento con DNasa libre de RNAsas (RNase-Free DNase Set, Qiagen, 97254), la sgRNA fue purificada utilizando el kit MEGAclean kit de Qiagen (AM1908).

En coordinación con la Unidad de Transgénesis de la Universidad de Salamanca, se abordó la microinyección de cigotos fertilizados de ratones C57BL/6 con la sgRNA purificada junto al mRNA de la Cas9 capeado en el extremo 5' y poliadenilado, listo para su transcripción intracelular (Sigma. Ref. Cas9-MRNA-1EA). Los cigotos microinyectados se implantaron en hembras de ratones CD1 hormonadas y pseudogestantes. Los ratones obtenidos se genotiparon mediante amplificación por PCR a partir de DNA de la cola del exón 1 de *Tmem59*, clonaje de las bandas obtenidas utilizando el TOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen, 450030) y secuenciación posterior de al menos 10-15 colonias en busca de modificaciones de tipo *indel* (inserciones o deleciones) en la secuencia del exón 1 que produjeran codones stop prematuros e interrupción de la fase abierta de lectura. Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR para el genotipado fueron:

- Exon-1-forward: ATGGCGGCGCCAAAGGGGAAGCTTTGGG
- Exon-1-reverse: CTCGGGTAGGTGTGCAAGGGGTAGGTC

Las reacciones de secuenciación se realizaron en el Servicio de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer. Una vez obtenidas las secuencias, se llevó a cabo su análisis

utilizando las herramientas *SnapGene Viewer* (GSL Biotech, disponible en snapgene.com) y Blast de NCBI para efectuar los alineamientos con la versión silvestre del gen. Una vez identificado el ratón que contiene la modificación de interés, se abordaron los cruces adecuados para la obtención de animales homocigotos deficientes.

3.1.3 Genotipado del gen *Tmem59*

Las colas de los ratones se digirieron en 300 µl de buffer PCR-K (10 mM Tris-HCl pH 8.5, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% gelatina (Sigma G-1890), 0,45% Nonidet P40 (Sigma N6507), 0,45% Tween 20 (Sigma P-1379)) suplementado con 100 µg/ml de Proteínasa K (Roche 03115879001) preparada previamente a 10 mg/ml en 10 mM Tris-HCl pH 7.5. Las muestras se incubaron 4 horas a 55°C x 1000 rpms en un bloque con agitación, tras lo cual se sometieron durante 15 min a 96°C para inactivar Proteínasa K. Se utilizaron 0,9 µl de la mezcla resultante para realizar una reacción de PCR utilizando como cebadores dos oligonucleótidos que anillan en los extremos de la región codificante del exón 1 de *Tmem59* (Fw: ATGGCGGCGCCAAAGGGGAAGCTTTGGG; Rev: CTTCGGGTAGGTGTGCAAGGGGTAGGTC) para amplificar una banda esperada de 189 pares de bases.

El programa de PCR utilizado fue:

1x	96°C	4'
35x	95°C	30''
	68°C	30''
	72°C	1'
1x	72°C	10'
1x	4°C	∞

Debido a que la forma salvaje del exón 1 (189 pares de bases) es indistinguible por tamaño de la forma mutada (que contiene una delección de 8 nts), la mezcla de PCR se digirió con la enzima HincII. Esta enzima digiere el fragmento silvestre una sola vez, pero su diana

desaparece en la forma delecionada del exón (-8 nts). El patrón esperado de bandas para los diferentes genotipos posibles tras la digestión es:

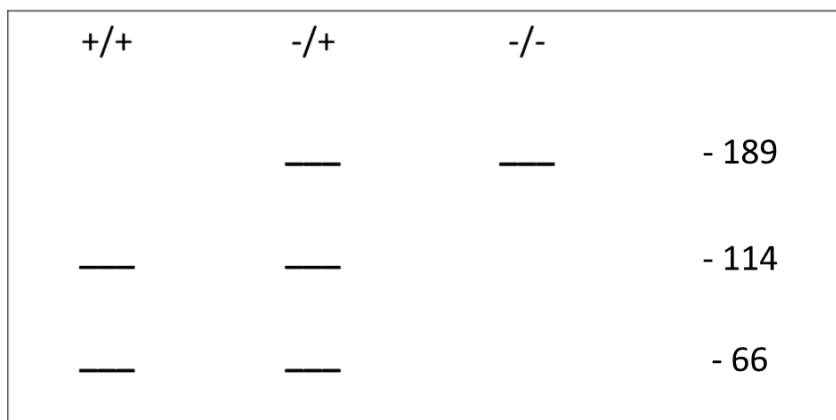


Figura 6. Esquema de los fragmentos de DNA esperados para cada genotipo de *Tmem59* tras la digestión del amplicón de PCR con HincII.

3.1.4 Aislamiento de MEFs de ratón

Se cruzaron entre sí ratones heterocigotos para *Tmem59* -8nt y se observó la generación de tapones para juzgar el inicio de la gestación. Las hembras preñadas se sacrificaron a días entre 13,5 y 14,5 y se extrajeron los cuernos uterinos para depositarlos en una placa de 10 cm con PBS1x Na⁺K⁺. Los embriones se extrajeron individualmente y se pasaron a placas individuales para separar la cabeza (que se conserva para el genotipado posterior) y extraerles el tejido "rojo" (hígado fetal) de la cavidad corporal. El resto del embrión se utiliza para generar MEFs mediante disgregación del tejido utilizando una hoja de afeitar y la incubación en tripsina 1x a 37°C y durante 8 min. A continuación, se añade medio DMEM completo y se pasa todo el volumen a una placa grande de 15 cm. Las células se cultivan siguiendo protocolos convencionales (cuidando de evitar su sobreconfluencia) hasta su estabilización, momento en el cual se procede a su congelación. Los genotipos se adscriben a cada población de MEFs tras el genotipado de las cabezas utilizando los protocolos de genotipado descritos más arriba.

3.1.5 Inmortalización de MEFs primarios con antígeno T de SV40

Para ello se ha utilizado una línea celular derivada de HEK-293T denominada ψ 2: SV40 que porta el plásmido pZIPneoSV(X)1-Large T antigen²⁹⁶ capaz de producir retrovirus ecotrópicos (tropismo murino) de forma constitutiva. Cultivos subconfluentes (30%) de MEFs primarios recién descongelados se infectaron con sobrenadante de las células ψ 2: SV40 cultivadas a alta confluencia (90%). Para ello, el sobrenadante se filtró contra un filtro de jeringa de 0,45 μ m y se diluyó 1:1 en medio fresco con 16 μ g/ml de polibreno para generar una solución final que contiene 8 μ g/ml de polibreno. Esta solución se añadió a los MEFs subconfluentes que posteriormente se incubaron durante 4 horas a 37°C. Este paso de infección se repitió de nuevo una vez más. Los cultivos resultantes se pasaron cada 2-3 días (aproximadamente 1:6) y se congelaron tras 3-4 pases, momento en que se consideraron inmortalizadas.

3.1.6 Estudios de patología de ratón

Los procedimientos de fijación y tinción de los diferentes tejidos de ratones salvajes y *Tmem59*-deficientes fueron realizados en la Unidad de Patología del Centro de Investigación del Cáncer siguiendo protocolos convencionales. Brevemente, tras la eutanización de los ratones, la Unidad de Patología abordó la disección y fijación de los diferentes tejidos en formol al 10% durante 24 horas a temperatura ambiente. Tras ello, las muestras se procesaron para inclusión en parafina mediante tratamiento en xilol y alcoholes degradados hasta dejarlos en parafina líquida y finalmente en bloques sólidos listos para su corte en el microtomo. Posteriormente, cortes de 2-3 μ m se sometieron a tinción con Hematoxilina-Eosina siguiendo protocolos clásicos que finalmente tiñen los núcleos celulares en azul, los citoplasmas en rosa, el músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, los glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

3.2 Cultivos celulares

3.2.1 Líneas celulares

La línea HEK-293T-AU-BCL-xL-CrmA-p35 es derivada de células HEK-293 (variante de células embrionarias de riñón humano HEK-293 transformadas con el antígeno T del virus SV40) mediante la transfección de plásmidos antiapoptóticos y posterior selección de colonias

estables. Esta estirpe celular ha sido utilizada para la producción de retrovirus y lentivirus. Los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) se obtuvieron a partir de ratones WT y deficientes en TMEM59 tal y como se detalla en el apartado 4.1.2 Generación de un ratón deficiente en TMEM59 mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

3.2.2 Condiciones para el cultivo celular

Las células se cultivan en un incubador con niveles de temperatura (37°C), CO₂ (5%) y humedad constantes. Las células se mantienen en medio DMEM (DMEM con piruvato de sodio, glucosa y sin glutamina; Gibco, Invitrogen, Ref. 21969-035). A este medio se le debe añadir suero bovino fetal (FBS, Gibco, Invitrogen) al 10% previamente inactivado al 56°C durante aproximadamente 30 minutos, 2mM de L-glutamina (Gibco, Invitrogen, Ref. 25030) y antibióticos: 100 µg/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (penicilina/estreptomina, Gibco, Invitrogen, Ref. 15140).

3.2.3 Mantenimiento celular

Las células adherentes, tanto HEK-293T como MEFs, fueron diluídas y cambiadas de placa cada 2-3 días usando un protocolo estándar de tripsinización que implica lavado con PBS1x Na⁺/K⁺ (8.5 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ y 137 mM NaCl en agua MilliQ, generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del CIC), incubación a 37°C en suficiente tripsina/EDTA (Gibco, Invitrogen, Ref. 25300) como para cubrir las células en la placa, neutralización de la tripsina añadiendo 5 ml del medio DMEM completo, y posterior disgregación de las células mediante pipeteo repetido contra la propia placa. La suspensión celular se centrifuga a 1500 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se resuspenden las células en el volumen deseado de medio fresco completo. La dilución varía en función de la línea celular o incluso del estado de las células. Generalmente, los MEFs y las células derivadas de HEK-293 se diluyeron respectivamente 1:10 y 1:5. En caso de querer plaquear un número concreto de células (para someterlas a procedimientos experimentales al día siguiente), la suspensión celular se contó con una cámara Neubauer utilizando el reactivo azul de tripán (Sigma-T8154). Las células vivas se pueden distinguir fácilmente de las células muertas utilizando este colorante vital que se penetra específicamente en las células muertas. El uso de este tinte en combinación con la cámara Neubauer permite cuantificar la cantidad de muerte celular

presente en un cultivo dado: las células muertas aparecen como manchas oscuras y deben ignorarse. El número de células viables sembradas para experimentación se determinó en función de la línea celular, de las condiciones del experimento a realizar y del formato de placa empleado.

3.2.4 Congelación y descongelación de líneas celulares

Las células pueden almacenarse durante años en nitrógeno líquido (-150°C) en presencia de DMSO (10%) como crioprotector. Las células HEK-293T se congelaron en DMEM completo que contiene DMSO al 10% (Sigma, calidad de cultivo de tejidos Hybri-Max DMSO. Ref. D2650), mientras que, para los MEFs, que son más sensibles, el medio de congelación es FBS puro que contiene DMSO al 10%. Como regla general, se pueden congelar dos criotubos por placa de 10 cm. Las células que se van a congelar deben estar densas, pero subconfluentes (alrededor del 80% de confluencia) en el momento de la recolección para una mejor recuperación del crecimiento celular después de la descongelación. La descongelación se realizó rápidamente introduciendo el tubo en el baño de agua a 37°C, y posteriormente añadiendo medio fresco lentamente para evitar choques osmóticos al diluir el DMSO. Tras centrifugar las células, éstas se resuspendieron en medio fresco y se sembraron en placas de cultivo en condiciones normales.

3.3 Obtención de líneas celulares estables mediante transducción retroviral

3.3.1 Características del vector retroviral

La mayoría de los vectores retrovirales disponibles proceden del genoma del *Murine Leukemia Virus* (MLV) que, además de incluir en los extremos las dos LTRs (Abr. LTR, del inglés *Long Terminal Repeat*) que definen las regiones promotoras y terminadoras de transcripción, originalmente codificaban las tres actividades necesarias para la infección productiva del virus: gag, pol y env. Estas tres actividades han sido eliminadas en los vectores retrovirales dando lugar a espacio suficiente en el genoma como para clonar elementos génicos de interés. Para que los viriones sean infectivos y capaces de empaquetar apropiadamente el vector, las actividades gag, pol y env deben proporcionarse en trans, es decir, codificadas por otros

vectores que actúan como *helper*. Los plásmidos *helper* utilizados en este trabajo han sido pMD-MLV-OGP (que aporta las actividades gag y pol), y pMD-VSV-G (que aporta la actividad env y confiere un tropismo amplio tanto para células de ratón como humanas, mientras que el plásmido retroviral utilizado ha sido p12-MMP. Todos estos plásmidos provienen del laboratorio de Dr. Richard C. Mulligan (Harvard Medical School, USA), y se usaron para producir partículas retrovirales infecciosas para transducir de manera estable líneas celulares de ratón (MEFs).

Las construcciones retrovirales utilizadas en este trabajo son:

- p12-MMP-TMEM59-HA: el inserto TMEM59 fue generado mediante PCR y posteriormente clonado entre Hind3 y Pci1 en un vector que contiene la etiqueta HA entre los sitios BspHI (compatible con Pci1) y Not1. La etiqueta peptídica HA es derivada de la glicoproteína hemaglutinina (HA) del virus influenza humano²⁹⁷.
- p12-MMP-TMEM59-mRFP: el inserto TMEM59 fue generado mediante PCR y posteriormente clonado entre Hind3 y Pci1 en un vector que contiene la etiqueta mRFP entre los sitios BspHI (compatible con Pci1) y Not1. mRFP1 es una proteína roja fluorescente derivada de *Discosoma*²⁹⁸.
- p12-MMP-GFP-LC3: el inserto LC3A fue clonado por PCR de una librería de cDNA humana y ligado en un vector p12-MMP-GFP entre los sitios Pci1 y Not1. E-GFP (del inglés, *Enhanced Green Fluorescent Protein*): GFP es una proteína verde fluorescente derivada de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*²⁹⁹. Originalmente fue identificada por el laboratorio de Dr. Tsien (Universidad de California, San Diego, California, USA) y luego fue optimizada por Cormack *et al.*³⁰⁰

3.3.2 Procedimiento para generar líneas celulares estables vía retroviral

Con objeto de generar sobrenadantes virales, se co-transfectaron células HEK-293T-AU-BCL-xL-CrmA-p35 con el vector p12-MMP que porta el transgén relevante junto a los plásmidos pMD-MLV.OGP y pMD-VSV-G, en una relación relativa 1:0,75:0,3 respectivamente. Al día siguiente se cambió el medio y se dejó acumular el virus en el sobrenadante durante 24 h adicionales. Tras ello, se recogió el sobrenadante viral, se centrifugó y posteriormente filtró (frente a 0,45 µm de un filtro con baja adsorción proteica de Acetato de Celulosa, Whatman,

10462100) para eliminar restos celulares y se diluyó 1:1 en medio fresco con 16 µg/ml de polibreno para generar una solución final que contiene 8 µg/ml. El Polibreno (Hexadimethrine bromide, Sigma; Ref. H-9268) es un polication que favorece las interacciones electrostáticas entre dos membranas negativas: la membrana celular y el envelope del virus, favoreciendo así la entrada del virus. Esta mezcla viral se añadió sobre las células diana sembradas el día anterior y las placas se centrifugaron a 2000 rpm y 32°C durante 2 horas (quitar el freno de la centrífuga tanto para subir como para bajar de revoluciones). Una vez acabado el tiempo de centrifugación las células se introdujeron en el incubador y se lisaron posteriormente para evaluar la expresión de los transgenes relevantes, bien por microscopía de fluorescencia o bien por Western-blot.

3.4 Métodos de biología molecular

3.4.1 Amplificación por PCR

Las reacciones de PCR se realizaron rutinariamente en presencia y ausencia de 10% DMSO (dos reacciones por producto de PCR deseado), dado que su presencia puede mejorar drásticamente la eficiencia de la PCR o eliminar por completo la amplificación. La enzima utilizada para la amplificación fue Pfu (Promega, M7745) que presenta actividad de corrección de pruebas para mejorar la fidelidad de la amplificación. Para cada reacción se mezclaron:

3 MATERIALES Y MÉTODOS

(En este orden)	<u>-DMSO</u>	<u>+DMSO</u>
Agua esterilizada MilliQ	42 μ l	38 μ l
DMSO	-	5 μ l
Buffer Pfu (10x stock)	5 μ l	5 μ l
DNA template (0,5 μg/μl stock)	1 μ l	1 μ l
Oligo fw (1 μg/μl stock)	0,25 μ l	0,25 μ l
Oligo rev (1 μg/μl stock)	0,25 μ l	0,25 μ l
dNTPs (20 mM stock)	0,5 μ l	0,5 μ l
Pfu polymerase	0,5 μ l	0,5 μ l
VOLUMEN FINAL: 50 μl		

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador T100 (BioRad) en las siguientes condiciones de ciclos:

1. Un ciclo de desnaturalización: 4 minutos a 96°C.
2. 20-25 ciclos de amplificación (dependiendo de la eficiencia de la reacción):
 - 1 minuto a 95°C (desnaturalización).
 - 1 minuto a 58°C (anillamiento).
 - 2 minutos a 72°C (extensión).
3. Un ciclo de extensión final: 10 minutos a 72°C.
4. Un ciclo de mantenimiento: tiempo infinito a 4°C.

La reacción de PCR se analizó mediante un gel de agarosa al 1%. Se cogieron 10 μ l de la mezcla de reacción y se les añadieron 1,5 μ l de buffer de carga Orange G (30% Ficoll, 10 mM

EDTA, 1,5 mg/ml Orange G (Sigma-Aldrich, F-4375)). Preparar la agarosa al 1 % (m/v, Agarosa D1, low EEO, Laboratorios Conda, Ref. 8016) en TAE 1x (tampón Tris acetato-EDTA: 40 mM Tris, 1 mM EDTA en agua MilliQ, generado como solución stock TAE 50x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) conteniendo 0,5 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). El buffer TAE 1x complementado con bromuro de etidio se usó también como tampón de electroforesis. Las muestras se corrieron junto a un marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen, SM1331). Las bandas del gel se visualizaron y revelaron con un transiluminador GelDoc2000 (BioRad) y, si presentan buena amplificación en el tamaño molecular esperado, se procedió a su purificación mediante las columnas PCR QIAquick (Qiagen, 28104), siguiendo el procedimiento detallado por el fabricante. La ligación del fragmento de DNA en el vector implica la digestión del producto de PCR purificado con las enzimas de deseada. Proceder como de costumbre para correr un gel de bajo punto de fusión, cortar la banda y ligar en el vector deseado (ver más abajo).

3.4.2 Diseño de los oligonucleótidos cebadores para la PCR

Para clonar el producto de PCR, tanto los cebadores *forward* como los *reverse* incluyen secuencias 5' no hibridantes que contienen dianas de restricción, de modo que se puede digerir el producto de PCR y ligarlo en el vector de interés. La parte de hibridación es de alrededor de 25 nucleótidos, con un contenido de por lo menos 50% de G o C (guanina o citosina). Las enzimas no digieren bien cerca de los extremos del ADN, por lo que hemos usado abrazaderas en la región 5' para facilitar el corte (GGGCCC en el oligo *forward* y CCCGGG del oligo *reverse*). Los oligos se pidieron a Sigma o Thermo y se resuspenden a 1 µg/µl en TE 1X (Tris-EDTA solución 1x, pH 8.0; generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) y se almacenaron a -20°C para su conservación durante largos periodos de tiempo.

Los oligonucleótidos utilizados para las diferentes construcciones son:

- TMEM59-Hind3-fw: GGGCCCAAGCTTGCCACCATGGCGGCGCCGAAGGGGAGCCTC
- TMEM59-PciI-rev: CCCGGGGCACATGTTAATTTTCAGAAATGAGCAAGATTCAC
- LC3A-PciI-fw: GGGCCCACATGTCCATGCCCTCAGACCGGCCTTTCAAG
- LC3A-Not-rev: CCCGGGGCGGCCGCTTTAGAAGCCGAAGGTTTCTGGGAGGC

3.4.3 Digestión del vector y el inserto con enzimas de restricción, purificación de los fragmentos de DNA y ligación

Las bandas de PCR purificadas o los plásmidos preexistentes se digirieron con las enzimas de restricción relevantes en un volumen total de 10 μ l durante toda la noche. La preparación del vector se trató al día siguiente con la fosfatasa CIP (del inglés *Calf Intestinal Phosphatase*; 0,4 μ l, 37°C durante 30 minutos) con objeto de defosforilar los 5'-fosfatos del vector reduciendo la probabilidad de que se religue de forma ilegítima y proporcione fondo en las ligaciones. Posteriormente, con objeto de separar los fragmentos de interés que van a ser ligados, ambas preparaciones se corrieron en un gel de agarosa con bajo punto de fusión, de alta calidad y testada para función enzimática que permite efectuar la ligación simplemente mezclando las bandas relevantes sin necesidad de purificación: Agarosa NuSieve Low Melting al 1,2%) (GTG Cambrex, Ref. 50080). Los geles *low melting* que se usaron en el laboratorio son de tensión superficial. Se hacen añadiendo 11 ml de agarosa NuSieve fundida (en TAE1x y con EtBr 0,5 μ g/ml) sobre un vidrio y peine y dejándolos gelificar durante 40 min. Los pocillos generados así pueden acoger un máximo de 16-18 μ l. Tras la separación de los diferentes fragmentos en el gel, se cortaron las bandas de interés bajo un transiluminador de luz ultravioleta y se usaron directamente en la reacción de ligación.

Para la ligación de los fragmentos deseados se establecen dos reacciones: un control que contiene sólo vector, y otra que incluye el vector más el inserto. La mezcla de reacción contiene por cada tubo:

Agua MilliQ autoclavada	8,25 μ l
BSA (enzyme grade, NEB 10mg/ml)	0,5 μ l
Buffer de ligación 10x	1,25 μ l
T4-DNA Ligasa (NEB)	0,4 μ l
Volumen total	10,0 μ l

Ambos tubos con la mezcla de ligación se pusieron en un bloque térmico a 37°C y los tubos con las bandas de vector e inserto incluídas en agarosa low melting se fundieron en otro bloque térmico a 65°C. A ambos tubos se les añadieron 1,5 µl de la mezcla agarosa/vector mientras que a sólo uno de ellos se añadieron 2,2 µl de inserto. Las reacciones de ligación se dejaron incubar a temperatura ambiente durante al menos 3 h antes de proceder a transformar bacterias competentes con ellas.

3.4.5 Transformación de bacterias competentes *E. coli* DH5α con la mezcla de ligación y verificación de las construcciones obtenidas

Del mismo modo que la agarosa NuSieve presenta suficiente calidad como para no inhibir las reacciones enzimáticas, tampoco afecta a la transformación de bacterias competentes, por lo mezcla de ligación se puede usar directamente para transformar bacterias. La transformación implica poner en contacto el DNA con las bacterias competentes en hielo y dar un choque térmico de tiempo muy definido. El plásmido transformado necesita tiempo para expresar la resistencia al antibiótico antes de que las bacterias puedan ser plaqueadas en medio selectivo (placa con ampicilina). Para ello, se añade una capa de LB-Agar 1,5% (TOP AGAR) sin ampicilina 20 minutos antes de plaquear. Las bacterias plaqueadas sobre este TOP-AGAR tienen margen suficiente para expresar la resistencia en el tiempo que tarda la ampicilina en difundir desde la placa hasta la superficie del TOP-AGAR.

Para abordar la transformación se utilizaron bacterias competentes de la estirpe DH5α de *Escherichia coli* (una cepa clásica para propagación de plásmidos recombinantes), producidas por el Servicio de Lavado y Esterilización del CIC con una competencia igual o superior a 5×10^7 colonias/µg. Inicialmente se fundió completamente la mezcla de ligación incubándola a 65°C en un bloque térmico mientras las bacterias se descongelan lentamente en hielo. Una vez descongeladas, se generan alícuotas de 100 µl y se incuban durante 30 min en hielo con 4,5 µl de la mezcla de ligación fundida. Tras ello se incuban durante 45 segundos a 42 °C en un baño de agua y se mantienen dos minutos adicionales en hielo antes de ser extendidas en una placa de LB-agar 2% con Ampicilina (Amp) 100 µg/ml (generadas por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) previamente cubierta por una capa de 10 ml de LB-agar 1,5% sin Amp. Al día siguiente por la mañana se examina si el número de

colonias producidas por la ligación control (sólo vector) es sustancialmente menor de las producidas por la mezcla de vector más inserto, indicando la existencia de ligación específica.

En este caso, se picaron al menos 2 colonias de la ligación, se crecieron en minicultivos líquidos de LB-Amp (100 µg/ml) y se incubaron toda la noche. Al día siguiente se purificó el DNA plasmídico utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit® de Qiagen (Ref. 27106, siguiendo exactamente las instrucciones del fabricante, y se cuantificó la concentración de DNA obtenido utilizando un equipo NanoDrop2000® (Thermo-Fisher) disponible en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer.

Para verificar la identidad de las construcciones obtenidas, se digirió el DNA de las minipreparaciones (aproximadamente 0,5 µg) con las enzimas de restricción relevantes y se verificó la liberación de los fragmentos esperados en un gel de agarosa del 1%. Una cantidad equivalente de DNA no digerido se corrió en paralelo para verificar la presencia de formas superenrolladas de buena calidad. En caso necesario, el DNA fue evaluado también mediante secuenciación en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer. Para ello, se prepara una mezcla de 250 ng del DNA plasmídico con 25 nmoles del oligonucleótido inserto y se enrasa con agua MilliQ hasta completar un volumen de 8 µl. Esta mezcla se entrega al Servicio de Genómica y Proteómica para ser procesada mediante el equipo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Hitachi). Una vez procesada la muestra, se lleva a cabo el análisis de la secuencia por *SnapGene Viewer* (GSL Biotech, disponible en snapgene.com). Finalmente, se emplea la herramienta Blast de NCBI para efectuar los alineamientos y búsquedas de secuencias desconocidas. Una vez analizado y validado se procede a generar el DNA plasmídico a gran escala.

3.4.6 Preparación de DNA plasmídico a gran escala

Para la extracción y purificación del DNA plasmídico se siguió exactamente los protocolos de los kits Qiagen Plasmid Midi Kit® y Qiagen Plasmid Maxi Kit® (Qiagen) para midiprep y maxiprep respectivamente. Se inocularon cultivos grandes con 0,5-1ml del minicultivo de aquellas colonias que resultaron positivas (100 ml o 400 ml de LB/Amp (50 µg/ml) para midi y maxi respectivamente y se incubaron entre 18 y 20 h a 37°C con agitación de 250 rpms. La lisis bacteriana y la purificación del DNA plasmídico se hizo siguiendo estrictamente las

instrucciones de los fabricantes. El rendimiento habitual fue de 80-100 µg en el caso de las midipreps y 400-500 µg para las maxipreps. El DNA obtenido se volvió a someter tanto a digestión y secuenciación para su validación completa.

3.5 Lisis de células en cultivo

3.5.1 Lisis celular mediante el buffer SB2x

Con objeto de obtener lisados totales de células de mamífero en cultivo, se utilizó un buffer denominado SB2x (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (v/v) y 20% de glicerol (v/v) en agua MilliQ) que al contener una alta concentración del detergente iónico SDS es capaz de extraer exhaustivamente las proteínas de la célula independientemente de su localización intracelular. Las células adherentes fueron resuspendidas mediante el uso de un raspador celular (*rubber policeman*) y se recogieron en tubos Falcon de 15 ml para ser centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Las células se lavaron en PBS1x Na⁺K⁺ frío y la suspensión celular se transfirió a un tubo Eppendorf en el que el pellet se resuspendió en tampón SB2x conteniendo inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (10 µg/ml, Roche) y PIC (1%, v/v, de Sigma Aldrich). Las muestras se sometieron a vórtex vigoroso y posteriormente fueron hervidas a 100°C durante 15 minutos y centrifugadas durante 5 min a velocidad máxima en una microfuga para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes fueron transferidos a un tubo nuevo para determinar su concentración de proteína y su almacenaje definitivo a -70°C.

3.5.2 Medición de la concentración de proteínas en los extractos celulares

Las mediciones de las concentraciones de proteínas se realizaron mediante el kit de Bio-Rad "DC-Protein Assay" (Ref. 500-0116) que utiliza la metodología de Lowry. Esta técnica permite medir mediante colorimetría las reacciones de compuestos aromáticos de las proteínas en una disolución de tartrato cobre alcalino, reactivo de Folin y una solución de tensioactiva. Tras la reacción se obtiene una disolución de color azul y su intensidad se correlaciona con la cantidad de proteínas que hay en cada muestra. La principal ventaja de este método es que es compatible con una amplia variedad de detergentes, por lo que es particularmente útil cuando se utilizan tampones de lisis atípicos. El ensayo se realizó en una placa de cultivo celular de 96

pocillos siguiendo las instrucciones del fabricante, y se midió utilizando el lector de placas Ultra Evolution y el software Xflour. Para preparar el reactivo de trabajo se añade 1 μl de reactivo S por cada 50 μl de reactivo A. Se utilizan 25 μl de reactivo de trabajo por muestra y estándar. Las muestras se diluyen por duplicado y luego se miden también por duplicado (un total de cuatro mediciones por muestra). Para preparar las rectas patrón se utilizaron diluciones de BSA (2 mg/ml, vendido por Pierce, Ref. 23209) en agua MilliQ estéril que contenga tanto tampón de lisis como tienen las diluciones de las muestras. La recta estándar se generó entre 0 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, con concentraciones de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 1,5 y 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las muestras se diluyeron con agua MilliQ estéril típicamente 1:6, dos diluciones por muestra. Para cada punto se pipetearon 25 μl del reactivo de trabajo por muestra y estándar en los pocillos de una placa de cultivo de celular de 96 pocillos (fondo plano), a los cuales se añadieron 5 μl de los estándares y muestras y, posteriormente, 200 μl de reactivo B a cada pocillo. Se dejó completar la reacción en un agitador orbital a 130-140 rpm durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 690 nm en un espectrofotómetro UltraEvolution (Tecan) ligado al software XFluor. La recta patrón fue utilizada para extrapolar las concentraciones de las proteínas totales de las muestras de los ensayos.

3.6 Western-Blot

3.6.1 Electroforesis de proteínas sobre el gel de poliacrilamida y Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) separa las proteínas según su peso molecular. Para lograr esto, las proteínas deben cargarse uniformemente (negativamente) para promover su migración a través del gel hacia el polo positivo. Esto se hace hirviendo muestras de proteína en presencia del detergente fuerte SDS y el agente reductor 2-mercapto-etanol (2-ME), ambos proporcionados por una solución estándar llamada *Reducing Sample Buffer* (RSB). Estas condiciones favorecen la desnaturalización de la proteína y la incorporación de SDS a la proteína desnaturalizada. Dado que las muestras ya se han generado en SDS (solución SB2x), su preparación para la electroforesis contempla su dilución en un tampón idéntico conteniendo 2-ME y azul de bromofenol como marcador del frente.

3.6.2 Preparación de geles de poliacrilamida

Los geles de acrilamida contienen dos partes: una parte superior para la concentración de la muestra (pH 6,8, siempre 5% de acrilamida) y una parte inferior para la separación de la muestra (pH 8,8 porcentaje de acrilamida variable).

Reactivos:

-MilliQ, agua esterilizada

-Mezclas de tampón TRIS inferior (1,5 M Tris pH 8,8; 0,4% SDS) y TRIS superior (0,5 M Tris pH 6,8; 0,4% SDS) concentradas 4x, generados por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

-Mezcla de acrilamida/bisacrilamida (concentración total: 30%; proporción de 37,5: 1 entre Acr: Bis; Bio-Rad 1610158).

-TEMED como agente de polimerización (Sigma, T9281).

-Persulfato de amonio (APS) como agente de polimerización (sólido diluído al 10% en MilliQ, agua estéril; Sigma A3678).

Para preparar el gel separador (inferior, pH 8,8) se mezclaron el agua MilliQ, acrilamida (en cantidad variable dependiendo del porcentaje de gel deseado) y la solución TRIS inferior en un tubo Falcon de 50ml. Posteriormente se agregan los agentes polimerizantes TEMED y APS y la mezcla se vierte en el molde de vidrio del sistema de minigeles de Bio-Rad. Inmediatamente se añadió agua MilliQ estéril (aproximadamente 1 ml aproximadamente) encima del gel de resolución con una pipeta Pasteur para generar una capa libre de oxígeno que facilita la polimerización (el oxígeno inhibe la polimerización). Se dejó polimerizar el gel de resolución unos 20-25 min aproximadamente.

El porcentaje de gel superior es constante (5%). Para su preparación se mezclaron el agua MilliQ, la acrilamida y la solución TRIS superior, se le añadieron el TEMED y APS, se vertió la solución sobre el gel de resolución previamente secado con papel de Whatman y se dejó polimerizar el gel durante 20-25 min aproximadamente.

3.6.3 Preparación de muestras para electroforesis (PAGE)

En los ensayos de Western-blot mostrados en esta tesis se cargaron normalmente alrededor de 20-30 μg de proteína total por pocillo en el formato minigel de Bio-Rad. Para preparar las muestras, se diluyeron cantidades iguales de proteína de las diferentes muestras y se les añadió suficiente reactivo RSB2x (con 2-ME y azul de bromofenol) como para diluir las muestras al menos 1:1 y normalizar los volúmenes de todas las muestras. Estas preparaciones se incubaron a 100°C durante 10 minutos, se centrifugaron a velocidad máxima durante 4 min (RT) se cargaron inmediatamente en el gel junto a un marcador de peso molecular de proteínas (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad). Los geles se corrieron en un *Running buffer* 1x estándar generado a partir del stock 10x SDS-PAGE (Tris 0,25 M; glicina 2 M; SDS al 0,5%; preparado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) a 100 V hasta que el frente de azul de bromofenol alcance el final del gel.

3.6.4 Transferencia de proteínas para Western blot

Una vez que las proteínas están separadas mediante la electroforesis, se procede a transferir las proteínas a una membrana PVDF (Immobilon, Millipore, IPVH00010) utilizando el sistema Mini-Trans blot® (BioRad). La transferencia es promovida por la migración al polo positivo de las proteínas aún cargadas negativamente por SDS.

El tampón de transferencia 1x (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol (v/v) en agua MilliQ) se preparó a partir de un stock 10x generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. El gel se extrajo de su soporte y se lavó en esta solución durante 10-15 min a 4°C para eliminar el SDS sobrante. Simultáneamente, se procedió a activar las membranas PVDF mediante incubación durante 5 minutos en metanol, lavado 5 minutos en agua MilliQ y equilibrado en buffer de transferencia durante otros 5 minutos. La transferencia se efectuó en frío, a tensión constante de 100 voltios y durante 2 horas con agitación continua.

3.6.5 Incubación con anticuerpos primarios y secundarios

Una vez acabada la transferencia, la membrana se somete a un proceso de bloqueo para saturar áreas de unión a proteínas inespecíficas, para posteriormente incubarla con los anticuerpos primarios y secundarios específicos.

Para ello, se extrajeron las membranas del sistema de transferencia y se incubaron en una solución TBS-T (25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl en agua MilliQ, con un 0,05% de Tween20, un detergente que ayuda a bloquear la membrana) en el que se realizarán todas las incubaciones y lavados de la membrana de Western-blot. La membrana se bloqueó en una solución de TBS-T con un 10 % de leche en polvo (m/v, Nestlé) durante 1 h a RT, o toda la noche a 4°C con agitación suave. Tras 3 lavados en TBS-T, se procedió a incubar las membranas con los anticuerpos primarios de interés diluidos en TBS-T con 2% BSA (Sigma-Aldrich, A3294) y 0.1% de azida sódica NaN₃ (m/v, Sigma-Aldrich). La incubación de las membranas con el anticuerpo se realizó a 4°C durante toda la noche o durante 1 hora a temperatura ambiente. Al acabar la incubación con el anticuerpo primario las membranas se lavaron 3 veces con TBS-T frío durante 30 minutos y se incubaron con una disolución de los anticuerpos secundarios relevantes. Éstos son generalmente inmunoglobulinas anti-conejo o anti-ratón que están acoplados a peroxidasa HRP (Jackson Immunoresearch), y se diluyeron 1: 5000 en leche al 5% en TBS-T. Las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavaron con TBS-T frío durante 30 minutos. Todos estos pasos se efectuaron en un agitador orbital a 100 rpms.

3.6.6 Revelado de las membranas de Western Blot

El revelado del Western-blot se lleva a cabo incubando las membranas con reactivos que son procesados por la peroxidasa HRP acoplada al anticuerpo secundario. Esta reacción produce quimioluminiscencia proporcionalmente a la cantidad de peroxidasa (HRP) presente en la muestra (y, por lo tanto, proporcional a la cantidad de primer anticuerpo y muestra). Los reactivos de revelado que han sido utilizados en esta tesis son ECL (GE Healthcare, RPN2106) o ECL-Clarity (BioRad, 1705061), más sensible, en función de la señal esperada. La visualización de la proteína esperada se llevó a cabo mediante exposición con películas SuperRX (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm) y una reveladora automática AGFA 1890 Classics E.O.S. Las

películas fueron posteriormente escaneadas y se seleccionaron las bandas de interés para incluirlas como figuras. Las membranas fueron reveladas varias veces con diferentes anticuerpos, bien de diferente especie, o bien previamente lavadas con una solución de Guanidina-HCl (7 N). Todos los Western-blot que están incluidos en esta Tesis fueron reproducidos al menos 5 veces.

3.7 Ensayos de inmunofluorescencia

Los experimentos de la inmunofluorescencia se efectuaron mediante el sembrado de las células sobre cubreobjetos de diámetro 10 mm (Thermo Scientific). Previamente estos cubreobjetos fueron tratados 50 μ l de poli-L-lisina al 0,01% (Sigma Aldrich) durante 30 minutos y luego se lavaron con agua MilliQ y PBS1x Na⁺K⁺. La poli-L-lisina tiene carga positiva por lo que interacciona con la membrana plasmática (con carga negativa), para así, facilitar la adhesión de las células sobre los cubreobjetos. Las células se sembraron directamente sobre los cubreobjetos cubiertos de poli-L-Lisina distribuidos en placas de 24 pocillos.

Tras finalizar el ensayo, las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS1x Na⁺K⁺ por pocillo y se fijaron con 0,5 ml de paraformaldehído al 4% (m/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na⁺K⁺ frío durante 15 minutos. El paraformaldehído fija las células y mantiene sus estructuras. Tras finalizar el tiempo de fijación, se lavaron las células con PBS1x Na⁺K⁺ frío 2 veces y se procedió a permeabilizarlas con 0.5 ml de PBS1x Na⁺K⁺/100mM Glicina/0.5% NP40 (v/v, Sigma-Aldrich) en frío durante 30 minutos. La glicina en esta solución se emplea con el fin de bloquear los grupos aldehído remanentes de la fijación con paraformaldehído. Tras finalizar el tiempo de incubación se volvieron a lavar 2 veces los cubreobjetos con PBS1x Na⁺K⁺ frío. En el siguiente paso, los cubreobjetos se incubaron con una solución de 2% BSA (m/v, Sigma-Aldrich) y 0.1% de azida sódica (m/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na⁺K⁺ durante 60 minutos a RT, tras lo cual se volvieron a lavar dos veces con PBS1x Na⁺K⁺. En el siguiente paso los cubreobjetos se incubaron con los anticuerpos primarios en una disolución 2% BSA (m/v) y 0.1% de azida sódica (m/v) en PBS1x Na⁺K⁺ durante 1 hora a RT. Tras lavar de nuevo con PBS1x Na⁺K⁺ se abordó la incubación con los anticuerpos secundarios (Jackson Immunoresearch) en una disolución de 2% BSA (m/v, Sigma-Aldrich) y 0.1% de azida sódica (m/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na⁺K⁺ durante 60 minutos también a RT. Todo el proceso de incubación con los anticuerpos se

efectuó en condiciones húmedas y a oscuras. Finalmente, se núcleos celulares se tiñeron con una solución de DAPI 1 µg/ml (Sigma-Aldrich) en PBS1x Na⁺K⁺ durante 5 minutos. Al finalizar la tinción se lavaron los cubreobjetos 3 veces con PBS1x Na⁺K⁺ y se procedió a fijarlos sobre los portaobjetos (LineaLab) con 4 µl de la resina PROLONG GOLD (Invitrogen, P36930). Se secaron a oscuras durante 24 horas y luego se sellaron con una laca de uñas transparente.

Los cubreobjetos con las células teñidas fueron analizados en un microscopio confocal SP5 de Leica en el (Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer). La búsqueda y toma de imágenes de las células se efectuó con los objetivos: PL APO 40x/1.25-0.75 oil CS; PL APO 63x/1.4-0.6 oil CS. Se utilizaron los siguientes láseres: Diodo UV 405 nm (azul), Argón multilineal 488 nm (verde), Helio-Neón 561 nm (rojo) y Helio-Neón 633 nm (rojo lejano). Las imágenes obtenidas fueron analizadas mediante el software LAS X Core (Offline version, Leica Microsystems).

3.8 Ensayos de infección bacteriana

3.8.1 Preparación de las bacterias

Las bacterias se extendieron en placas de Petri generadas con el medio relevante (*Brain Heart Infusion*, BHI, Laboratorios Conda 1048) o LB, según el tipo de bacteria usada, y antibióticos en función de si la bacteria expresa resistencia (ver tabla más abajo), por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Las bacterias se extendieron con un asa de inoculación estéril sobre la placa y se dejaron crecer en un incubador a 37°C el tiempo necesario para producir colonias distinguibles. Posteriormente se picaron colonias aisladas y se inocularon con ellas 5 ml del medio líquido de interés (con antibióticos si la cepa presenta resistencia) para ser incubadas toda la noche con agitación de 250 rpm a 37°C. Al día siguiente se cogieron aproximadamente 2 ml de medio con bacterias y se inocularon en un matraz con 200 ml de medio líquido (1:100) que a su vez se incubó a 37°C y con agitación 250 rpm. A partir de las 2 horas de crecimiento se fueron cogiendo alícuotas del cultivo para medir su densidad óptica hasta que el crecimiento bacteriano alcance una densidad de 5×10^8 CFU/ml (D.O. 0,5).

El procedimiento descrito anteriormente se aplicó a todas las bacterias utilizadas en esta Tesis salvo la cepa de *Streptococcus pyogenes*. Para este caso en particular, el medio de cultivo

empleado es BHI con un 2% de extracto de levadura y espectinomicina a 100 µg/ml como antibiótico de selección. Las bacterias extendidas en la placa se dejaron incubando durante 3 días a 37°C. En el cuarto día, se picó una colonia aislada y se transfirió a 5 ml del medio líquido BHI con espectinomicina a 100 µg/ml para ser incubado durante 3 días en un incubador con agitación de unos 250 rpm a 37°C. Finalmente, el día 7 se procedió a crecer el cultivo a gran escala, cogiendo aproximadamente 4 ml de medio con bacterias para inocular un matraz con 200 ml de medio líquido (1:50) que se incubó a 37°C y con agitación 250rpm. A partir de 4 horas se cogieron alícuotas para ser medidas en un espectrofotómetro hasta que el crecimiento bacteriano alcance una densidad de 5×10^8 CFU/ml aproximadamente. Una vez generado el cultivo a gran escala y con la densidad óptica deseada, se transfirió el volumen de cultivo correspondiente a la cantidad de CFUs requerida a un tubo eppendorf y se centrifugó a 9000 rpm durante 3 minutos a RT. Se aspiró el sobrenadante y se lavó el pellet bacteriano resuspendiéndolo en un 1 ml de PBS1x Na⁺K⁺, para centrifugar de nuevo a 9000 rpm durante 3 minutos a RT, repitiendo este paso 3 veces. Después del lavado se aspira el sobrenadante y se resuspende el pellet bacteriano en 1 ml de DMEM completo (sin antibióticos, 37°C) para proceder a los ensayos de infección.

3.8.2 Infección celular con las bacterias

Tras resuspender las bacterias en DMEM se infectan las células plaqueadas el día anterior empleando la multiplicidad de infección (MOI) deseada en un volumen final de 500 µl/pocillo de DMEM/FCS para las placas de 24 pocillos y de 2000 µl/pocillo para placas de 6 pocillos. Las placas se centrifugaron durante 5 minutos a 2000 rpm en condiciones de no aceleración ni freno y a temperatura ambiente. Las placas se incubaron posteriormente en el incubador de células a 37°C durante 45 minutos. A continuación, se aspiró el medio y se lavaron las células 3 veces con PBS1x Na⁺K⁺ a 37°C y dos veces con DMEM sin antibiótico a 37°C. Finalmente se añadió 1 ml de medio DMEM completo (sin antibióticos (pen/strep)) a 37°C suplementado con gentamicina (100 µg/ml) para eliminar todas las bacterias extracelulares, y se incubó el cultivo durante 1 hora a 37°C en el incubador convencional. El momento tras la finalización de esta incubación con gentamicina se define como tiempo "0 horas" en los experimentos de infección. A continuación, se aspiró el medio anterior y se añadió medio fresco DMEM/FCS con 10 µg/ml de gentamicina para puntos experimentales de tiempos más largos.

3.8.3 Tipos de bacterias y condiciones de crecimiento

Especies	Condición de crecimiento
<i>Shigella flexneri</i> M90T	Luria-Bertani (LB)
<i>Shigella flexneri</i> M90T + GFP	Luria-Bertani (LB) + Ampicilina 100 µg/ml
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344	Luria-Bertani (LB)
<i>Salmonella typhimurium</i> SL1344 + GFP	Luria-Bertani (LB) + Ampicilina 100 µg/ml
<i>Listeria monocytogenes</i> 7973	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)
<i>Listeria monocytogenes</i> 7973 + PSB2019	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI) + cloranfenicol 7 µg/ml
<i>Streptococcus pyogenes</i> 771 + pguap-gfp	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI) + espectinomicina 100 µg/ml
<i>Streptococcus pyogenes</i> 771 + pDL278	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI) + espectinomicina 100 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> RN6390 + GFP	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI) + cloranfenicol 10 µg/ml
<i>Staphylococcus aureus</i> wild type (47)	<i>Brain Heart Infusion</i> (BHI)

3.8.4 Tratamiento de los datos estadísticos

El análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos se efectuó mediante el programa de análisis Microsoft Excel versión 2112 y el software Python 3 y la librería de visualización Matplotlib. Los gráficos de columnas y de dispersión representan la media y la desviación estándar asociada a cada grupo experimental. El contraste de hipótesis entre dos grupos experimentales se efectuó mediante la prueba t de Student de dos colas (se analizaron las desviaciones en las dos direcciones). Esta prueba, aplicada a muestras independientes, asume una distribución normal de los datos y establece diferencias entre las medias de ambos grupos. El nivel de significación se fijó en el 5% ($p=0.05$).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 Estudios patológicos en los ratones deficientes en *Tmem59*

En este trabajo de tesis doctoral se ha realizado un amplio estudio para explorar las funciones fisiológicas de la molécula transmembrana TMEM59 utilizando, bien un ratón deficiente en esta proteína, o bien reactivos celulares derivados de éste.

En una primera ronda de experimentos se realizó un estudio patológico de múltiples tejidos del ratón deficiente con la intención de explorar la posible aparición espontánea de defectos observables. TMEM59 se expresa en prácticamente todos los tejidos a nivel de mRNA pero está fuertemente regulada a nivel postranscripcional²²⁴, por lo que podría tener tanto efectos universales a nivel de organismo como funciones específicas de los tejidos en los que su expresión se ve incrementada mediante mecanismos independientes de la transcripción.

De todos los tejidos examinados minuciosamente solo hemos encontrado diferencias en el tejido de la corteza cerebral. Se esperaba encontrar un fenotipo en el epitelio intestinal, puesto que los datos previos del laboratorio indican que TMEM59 interacciona con el dominio WD40 de ATG16L1 para llevar a cabo un nuevo proceso de autofagia atípica contra agentes infecciosos que se ve alterado en presencia del alelo de riesgo de T300A que incrementa el riesgo de sufrir enfermedades inflamatorias intestinales²²⁵. (véase apartado 1.4.3 Enfermedad de Crohn). Por tanto, una de las hipótesis planteadas previamente es que la ausencia de TMEM59 podría tener unos efectos similares a los producidos por la disfunción de genes involucrados en la respuesta inmune innata a patógenos, tales como NOD2 y ATG16L1, identificados también como loci de susceptibilidad para el desarrollo de enfermedad de Crohn³⁰⁵. Sorprendentemente, no ha sido así. Se llevarán a cabo experimentos futuros para comprobar si agresiones ambientales al

epitelio intestinal ayudan a revelar un papel de TMEM59 en la respuesta a situaciones de estrés intestinal.

En cuanto al tejido de la corteza cerebral, hemos podido observar que las células de los ratones *Tmem59*^{-/-} presentan una morfología diferente a los de sus homólogos silvestre (Figura 12). Esta diferencia podría atribuirse a que en los ratones KO hay un descenso de una determinada población de células, mientras que los ratones silvestres hay una población celular más heterogénea. Esta variación está comprendida entre la capa I y la IV de la corteza cerebral. Sin embargo, estos datos se deben tomar con precaución ya que para confirmar estos cambios harían falta experimentos adicionales en los que se examine la expresión de moléculas marcadoras de diferentes subpoblaciones de células cerebrales. Además, numerosos estudios publicados recientemente por otros grupos sugieren que TMEM59 desempeña un papel importante en varios procesos neuronales, incluida la regulación de: la proliferación y diferenciación de células madre neurales^{275,276}, en el desarrollo de la columna de las células dendríticas, la apoptosis de células de glioma, el desarrollo del sistema nervioso²⁷⁸, la activación de la microglía durante la neuroinflamación (véase apartado 1.6.1 Papel de TMEM59 en distintos procesos fisiopatológicos). Teniendo en cuenta estos datos es posible que la ausencia de TMEM59 pueda comprometer la presencia o función de alguna población celular de la corteza cerebral.

5.2 *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria gram positiva puede inducir la autofagia de las células huésped después de la infección. Las bacterias se internalizan a través de la endocitosis/fagocitosis y luego dañan a las membranas de los endosomas/fagosomas que rodean a la bacteria y escapan al citosol. La autofagia se dirige principalmente a las bacterias en el citosol o a las membranas de los endosomas/fagosomas dañadas por estas (véase apartados 1.5.3 Detección de los patógenos en fagosomas por parte del sistema inmune innato y 1.5.4 Detección de los patógenos en el citoplasma por parte de la maquinaria xenofágica). Además, los componentes de la pared celular de *S. aureus* pueden ser detectados mediante los PRR como PAMP para luego iniciar una cascada de señalización que culmina en la inducción de la autofagia²⁴⁵ (véase apartado 1.5.4 Detección de los patógenos en el citoplasma por parte de la

maquinaria xenofágica). Estudios recientes han demostrado que la autofagia juega un papel crucial en la defensa de las células huéspedes contra *S. aureus*²³³.

Según los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia que se muestran en este trabajo, esta inducción de autofagia ocurre a tiempos muy tempranos tras la infección (Figura 19A y B). Sin embargo, hemos observado que en paralelo también las vesículas de TMEM59 se dirigen tanto hacia los autofagosomas positivos para LC3 como hacia las células de *S. aureus* que están aparentemente libres en el citoplasma. Estos fenómenos dinámicos que afectan a las vesículas de TMEM59 se activan a la vez que la actividad autofágica dependiente de LC3 (Figura 19 y 20). Estos datos sugieren que las vesículas de TMEM59 podrían formar parte en la de una vía señalizadora de defensa antibacteriana alternativa a la autofágica, quizás relacionada con la ruta de señalización inducida por los PRRs.

Por otro lado, estudios de caracterización de TMEM59 efectuados previamente por nuestro laboratorio indican que TMEM59 se localiza en pequeñas vesículas citoplasmáticas que colocalizan fuertemente con LAMP2 y CD63, sugiriendo que TMEM59 es una proteína que se localiza principalmente en las membranas de los endosomas tardíos o lisosomas²²⁴. Estudios previos indican que los endosomas tardíos y los lisosomas suelen mostrar más bien una distribución perinuclear³⁰⁶, y en la mayoría de los tipos celulares pueden ser transportados hacia la periferia celular¹¹⁴ (véase apartado 1.2.5 Fase 4: Maduración, fusión y reciclaje). En los ensayos de inmunofluorescencia mostrados en este trabajo, las vesículas TMEM59-positivas presentan una distribución perinuclear en los MEFs no infectados (Figura 18A y B). También se ha medido el tamaño de estas vesículas TMEM59-positivas mediante microscopía confocal de alta resolución y el tamaño está alrededor de los 0,5 μm (Figura 18C). Estos datos coinciden con los descritos en la bibliografía para lisosomas³⁰⁷. Tomando en conjunto estos datos, los resultados de inmunofluorescencia apuntan a que las vesículas TMEM59-positivas podrían ser lisosomas que se dirigen a los autofagosomas LC3-positivos y a los endosomas dañados de *S. aureus* o directamente a bacterias citosólicas (Figuras 19, 20 y 21). Es preciso señalar que este último sería un fenómeno novedoso, ya que hasta ahora no está descrito que los lisosomas se puedan dirigir directamente a las bacterias sin tener que pasar por un proceso intermedio como autofagia o LAP (véase apartado 1.5 Xenofagia y Figura 5). Se trataría de un proceso parecido al de microautofagia (véase apartado 1.1.2 Características de la autofagia),

en el que los lisosomas pueden integrar cualquier parte del citoplasma mediante la invaginación de su membrana para llevar a cabo la degradación posterior del sustrato, que en este caso sería la bacteria. Es más, estudios recientes han demostrado que los lisosomas pueden procesar de manera directa las gotas de lípidos, un proceso que hasta ahora se pensaba que solo transcurría mediante autofagia³⁰⁸. Para confirmar esta idea sería interesante generar MEFs transducidos con TMEM59 y LAMP1 marcados con proteínas fluorescentes, puesto que LAMP1 es una proteína característica de los endosomas tardíos o lisosomas. Ensayos realizados en estas células podrían confirmar si estas vesículas de TMEM59 que acuden a englobar la bacteria son efectivamente lisosomas.

Por otra parte, varios estudios han demostrado que *S. aureus* es capaz de secretar una toxina formadora de poros (toxina α) para dañar las membranas de los endosomas y escapar al citosol, o incluso de manipular la vía de la autofagia para su replicación y diseminación³⁰⁹. Es decir, una vez que *S. aureus* ingresa al autofagosoma puede transformar este compartimento para crear un entorno en el que pueda sobrevivir y replicarse (véase apartado 1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores). Estas observaciones previas serían compatibles con nuestros datos obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia en los que a tiempos de 4 horas, a pesar de haber una fuerte inducción de autofagia, las vesículas LC3-positivas no acuden con tanta frecuencia (como en los tiempos de 0 o 2 horas) hacia localizaciones donde está *S. aureus*. Sin embargo, las vesículas de TMEM59 siguen acudiendo a *S. aureus* para englobarlo en su interior a tiempos tardíos (Figura 21B). Estos datos sugieren que a pesar de que *S. aureus* ha desarrollado mecanismos para escapar de la vía de la autofagia parece que no sea capaz de sortear el mecanismo defensivo vinculado a las vesículas de TMEM59.

En cuanto a los datos obtenidos mediante WB para evaluar la inducción de LC3-II endógeno en las diferentes líneas de MEFs infectados con *S. aureus*, no se observa ninguna diferencia tanto en presencia de TMEM59 como en su ausencia (Figura 23), sugiriendo que TMEM59 no actúa a través de su actividad autofágica no convencional previamente descrita en el laboratorio. Así, estudios previos del laboratorio indican que TMEM59 presenta un motivo que se une al dominio WD40 de ATG16L1 para promover el marcaje con LC3 de los mismos endosomas o lisosomas de membrana sencilla en los que se localiza esta molécula²²⁴ (véase

apartado 1.6.2 Trabajo previo del laboratorio). Por tanto, en el contexto de la infección de MEFs con *S. aureus*, parece que hay varios fenómenos que ocurren de manera simultánea en las etapas tempranas de la infección (0 y 2 horas), uno dependiente de TMEM59 e independiente de LC3, y otro dependiente de LC3. En cambio, a tiempos tardíos (4 horas), los resultados muestran que las vesículas de LC3 acuden en menor medida en comparación con las vesículas TMEM59-positivas. Según estos datos TMEM59 podría estar involucrada en la respuesta innata contra los patógenos intracelulares posiblemente mediante un proceso biológico novedoso basado en que las vesículas TMEM59-positivas integran directamente a *S. aureus* para su posterior degradación.

Estudios recientes han reportado que la infección por *S. aureus* causa enfermedades persistentes o agudas de larga duración que se asocian con una morbilidad y mortalidad significativas³¹⁰ debido a que aproximadamente el 90 % de las cepas de *S. aureus* muestran resistencia a múltiples antibióticos que usan para tratar enfermedades infecciosas provocados por este patógeno³¹¹. Los resultados obtenidos con TMEM59 podrían abrir nuevas vías terapéuticas para combatir y eliminar a este patógeno.

5.3 *Streptococcus pyogenes*

Evidencia publicada a lo largo de los años indica que cada bacteria tiene su propio mecanismo de defensa frente a la acción del sistema inmune y de la autofagia. En el caso del *S. pyogenes*, un importante patógeno humano, la bacteria ingresa en las células a través de la endocitosis/fagocitosis y luego se escapa al citoplasma secretando estreptolisina O (SLO), una toxina formadora de poros en la membrana de los endosomas/fagosomas producida por GAS²⁶⁹ (véase apartado 1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores) para evitar la posterior fusión del fagosoma con el compartimento lisosomal. Numerosos estudios han reportado que este proceso de escape de *S. pyogenes* ocurre en torno a 1 hora tras la infección^{304,312,313}. Este punto temporal es consistente con los datos observados en los ensayos de inmunofluorescencia que se presentan en este trabajo (MEFs infectados con *S. pyogenes*), donde no se aprecia ninguna interacción ni colocalización de TMEM59 con *S. pyogenes* y tampoco con LC3 en las etapas tempranas (0 y 0,5 horas) de la infección (Figura 24A y B), sugiriendo que a estos tiempos de infección *S. pyogenes* están dentro de los

fagosomas y no es detectada por los sistemas de alerta celular. Además, en los ensayos con GAL3 se observa la presencia fagosomas dañados por las bacterias a partir de las 2 horas tras la infección (Figuras 32 y 33). Esto es diferente a lo que ocurre en el caso de *S. aureus*, puesto que en estas condiciones ya se observa una fuerte inducción de LC3 rodeando a las bacterias y también una fuerte actividad de las vesículas TMEM59-positivas acudiendo hacia las vesículas LC3-positivas o directamente hacia las bacterias sin LC3. En este caso, los datos sugieren que la inducción de la autofagia dependiente de LC3 y la que implica a las vesículas de TMEM59 podrían tener un mecanismo de activación común, al menos en el inicio de estos procesos. Tras la ruptura de los fagosomas bacterianos, *S. pyogenes* citoplasmático es reconocido principalmente por el sistema de ubiquitina y los adaptadores de la autofagia para ser capturado por una estructura de doble membrana positiva para LC3, una vacuola similar a un autofagosoma que contiene GAS (GcAV) y que se degrada a través de la fusión de este compartimento con los lisosomas³⁰³. Consistentemente, en los ensayos de inmunofluorescencia que se muestran en este trabajo se puede observar que la formación de GcAV positivos para LC3 englobando a *S. pyogenes* ocurre a partir de 2 horas de infección (Figura 25B). Este proceso presenta una mayor actividad en torno a 4 horas tras la infección, un tiempo muy parecido al descrito por Nakagawa et al. (2004), puesto que en este trabajo observan que el pico de esta actividad se produce en torno 3 horas tras la infección³⁰³.

Por otra parte, las vesículas TMEM59-positivas acuden y colocalizan fuertemente con las GcAVs positivos para LC3 (Figura 27A y B), pero también acuden hacia células bacterianas no marcadas con LC3 para integrarlo en su interior (Figuras 25, 26). Es más, lo interesante es que en la misma célula se pueden observar dos procesos que transcurren de manera simultánea y aparentemente independiente, uno corresponde al proceso de autofagia formando GcAV LC3-positivos para englobar al *S. pyogenes*, y el otro es un proceso biológico novedoso promovido por las vesículas TMEM59 integrando también a las bacterias (Figura 25B). Estos resultados de *S. pyogenes* son muy similares a los observados para *S. aureus*.

No obstante, estudios recientes han demostrado que *S. pyogenes* puede replicarse de manera eficiente en el citosol de las células infectadas a través de un proceso que implica la proteólisis de las proteínas adaptadores de autofagia del huésped que dirigen las bacterias intracelulares hacia los autofagosomas. Esto es debido en gran parte a que *S. pyogenes* secreta

una proteasa SpeB en el citosol que es necesaria y suficiente para degradar las proteínas adaptadoras de autofagia tales como p62/SQSTM1, NDP52/CALCOCO2 y NBR1³⁰⁴. De forma consistente con estos datos, en nuestros estudios hemos observado que las colocalizaciones entre *S. pyogenes* y LC3 (es decir, la formación de GcAVs) se reducen considerablemente desde las 2 horas de infección hasta las 8 horas (Figura 31). Es importante destacar que las vesículas TMEM59-positivas que acuden e integran completamente a *S. pyogenes* aumentan considerablemente hasta casi el 90 % desde 2 a 24 horas tras la infección (Figura 31). Estas vesículas con el paso del tiempo se van encogiendo y el DAPI de las bacterias se va degradando hasta desaparecer (Figuras 29A y 30). Los experimentos de cuantificación de la viabilidad de *S. pyogenes* (véase apartado 4.3.4 TMEM59 favorece la eliminación de *S. pyogenes*) indican que los MEFs WT y MEFs KO transducidos con TMEM59 no solo reprimen la proliferación bacteriana, sino que también eliminan a *S. pyogenes* (Figura 35), mientras que en los MEFs deficientes en TMEM59 ocurre todo lo contrario: la bacteria sobrevive y prolifera en ausencia de TMEM59. En conjunto, todos estos datos demuestran que las vesículas TMEM59-positivas promueven la degradación de *S. pyogenes*.

Tal como se indicó más arriba, varios estudios publicados demuestran que *S. pyogenes* se escapa de los endosomas/fagosomas a para replicarse eficazmente en el citosol. Además, Barnett et al. publicaron un interesante estudio mediante microscopía electrónica indicando que, si bien hay una asociación transitoria con endosomas a las 2 horas tras la infección, solo el $2,3\% \pm 0,7\%$ de *S. pyogenes* intracelular se asoció con EEA1 o Lamp1 a las 6 horas posteriores a la infección, lo que sugiere que *S. pyogenes* escapa de la vía endosomal para replicarse libremente en el citoplasma³⁰⁴ y también para evitar los mecanismos de defensa autofágica tal y como se ha descrito anteriormente. Tomando en consideración estos estudios junto con los datos que indican que a 24 horas prácticamente todas las células de *S. pyogenes* están rodeadas por las vesículas TMEM59-positivas, el escenario más probable es que las vesículas de TMEM59-positivas acuden por un lado a las vacuolas GcAV LC3-positivas con *S. pyogenes* pero también, de forma independiente, hacia células de *S. pyogenes* completamente libres en el citosol para engullirlas y eventualmente degradarlas, un proceso que podría estar promovido a su vez por el propio TMEM59. Ambos eventos parecen tener vías de señalización y de activación sincronizadas, aunque luego, en etapas tardías de la infección, solo prevalece

la basada exclusivamente en TMEM59. Todos estos resultados apoyan y refuerzan la idea de que TMEM59 está involucrada en los mecanismos de defensa contra los patógenos, tal y como se había planteado en la hipótesis inicial de este trabajo.

Además, todos estos datos vuelven a apuntar a la misma sugerencia planteada por los resultados obtenidos con *S. aureus*, es decir, que las vesículas de TMEM59-positivas que integran y degradan a *S. pyogenes* posiblemente sean lisosomas, puesto que hasta ahora es el único orgánulo descrito capaz de llevar a cabo la degradación de los patógenos, aparte de reunir varias características de lisosomas descritas anteriormente. También aquí sería interesante generar MEFs transducidos con LAMP1-GFP y TMEM59-mRFP, para caracterizar a estas vesículas.

Por otra parte, asumiendo que estas vesículas sean realmente lisosomas, surgen otras preguntas: ¿cómo podrían estos lisosomas TMEM59-positivos dirigirse directamente a *S. pyogenes*?, ¿está la bacteria libre en el citoplasma o contenida en alguna vacuola dañada (endosoma/fagosoma)?, o ¿pueden estas vacuolas engullir directamente a *S. pyogenes* mediante invaginación de su membrana?. Estas preguntas podrían ser respondidas mediante estudios de inmunomicroscopía electrónica de transmisión, utilizando marcadores endosómicos tempranos (EEA1) y tardíos LAMP1 junto a anticuerpos contra TMEM59-HA. De esta manera se podrían caracterizar con más detalle estas vesículas TMEM59-positivas.

También sería interesante explorar la posible implicación de RUBICON, una molécula esencial en el proceso de la autofagia no canónica denominado LAP que también degrada bacterias infectivas (véase apartados 1.5.3 Detección de los patógenos en fagosomas por parte del sistema inmune innato), con objeto de determinar si existe alguna relación entre este proceso y la capacidad de las vesículas TMEM59-positivas de secuestrar y degradar la bacteria.

5.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un patógeno bacteriano gram-positivo que causa listeriosis, una enfermedad relativamente inocua en individuos sanos que se vuelve potencialmente letal en inmunodeprimidos, ancianos y mujeres embarazadas³¹⁴. Una de las características principales

de *L. monocytogenes* es su capacidad para replicarse dentro de varios tipos celulares durante la infección, incluidos los macrófagos, un tipo de célula especializada del sistema inmune que suele eliminar un rango muy amplio de bacterias intracelulares. Esto es debido a que *L. monocytogenes* dispone de un arsenal de toxinas que le permiten lisar las membranas de los endosomas/fagosomas y escapar al citosol, o secuestrar complejos de actina del huésped para sintetizar actina en su superficie y así enmascararse del sistema de defensa (incluida la autofagia) del huésped y ganar motilidad (véase apartado 1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores). Una vez accede al citosol *L. monocytogenes* puede replicarse más eficazmente en este entorno rico en nutrientes³¹⁴.

En los resultados obtenidos en los ensayos de inmunofluorescencia (véase apartado 4.4.1 TMEM59 colocaliza con *Listeria monocytogenes* durante la infección) no se ha observado interacción ni colocalización de *L. monocytogenes* con LC3 a pesar de que este último marcador está fuertemente inducido a tiempos tempranos tras la infección (0 horas y 30 min.). Del mismo modo, las vesículas TMEM59-positivas tampoco acuden hacia las bacterias a estos tiempos tempranos, aunque sí parecen interaccionar con LC3 en respuesta a la infección (Figura 36A y B). Sin embargo, a partir de las 2 horas de infección se observa que los autofagosomas positivos para LC3 rodean a *L. monocytogenes* y las vesículas TMEM59-positivas comienzan a colocalizar fuertemente con estructuras LC3-positivas. Además, las vesículas de TMEM59 también acuden en solitario hacia células de *L. monocytogenes* para integrarlas completamente (Figuras 37 y 38). Estos resultados vuelven a mostrar cómo las vesículas TMEM59-positivas desarrollan diferentes actividades biológicas ejecutadas en paralelo durante la infección con bacterias gram-positivas. En esencia, el tráfico intracelular de TMEM59 durante la infección con *L. monocytogenes* es similar al observado con *S. pyogenes* y *S. aureus*.

Por otro lado, conviene destacar que múltiples estudios han demostrado que *L. monocytogenes* puede escapar de la degradación autofágica^{315–324}. Estos estudios también indican que la autofagia se induce entre 1 y 2 horas después de la infección con una alta proporción de bacterias absorbidas por autofagosomas positivos para LC3. Sin embargo, esta proporción desciende drásticamente a partir de 6 horas³²², probablemente debido a que *L. monocytogenes* secreta varias toxinas que le permiten eludir los mecanismos de autofagia

(véase apartado 1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores). Es más, Bénédicte et al. han reportado que el crecimiento de *L. monocytogenes* es comparable en MEFs WT y *Atg5*^{-/-} tras 8 horas de infección, indicando que la autofagia tiene un efecto limitado en el crecimiento de *L. monocytogene* a tiempos tardíos³²⁰.

Es importante destacar que la actividad de las vesículas de TMEM59 contra la bacteria no solo se inicia a partir de 2 horas (Figura 37) junto a la actividad de autofagosomas positivos para LC3 (una vez más parece que estos eventos estén sincronizados en las etapas tempranas, de manera análoga a *S. aureus* y *S. pyogenes*), sino que se incrementa y se extiende hasta las 24 horas tras la infección (Figura 39). Es más, a partir de las 8 horas se observa que todas las vesículas de TMEM59 que hay en las células están integrando bacterias en su interior (Figuras 38 y 39). A lo largo del tiempo estas vesículas se encogen y se observa que la señal de DAPI que revela las bacterias se degrada progresivamente, sugiriendo que las vesículas de TMEM59 también eliminan a *L. monocytogenes* de manera análoga a *S. pyogenes*. Estos resultados también vuelven a señalar que las vesículas de TMEM59-positivas posiblemente sean lisosomas en los que la presencia de TMEM59 sea importante para detectar y degradar más eficazmente a las bacterias, quizás a través de algún posible ligando que interactúa con el sistema inmune innato o con las bacterias y que pueda actuar de forma independiente del motivo de unión al dominio WD40 de ATG16L1 que TMEM59 posee en su región intracelular. En todo caso, estos resultados apoyan y fortalecen nuestra hipótesis planteada inicialmente: que TMEM59 podría jugar un papel esencial contra las infecciones bacterianas.

Para fortalecer esta idea sería necesario efectuar futuros ensayos de infección en las diferentes líneas de MEFs y medir posteriormente el número de colonias viables que se pueden recuperar de las células infectadas a diferentes tiempos tras la infección. Este es un ensayo importante que no ha podido ser realizado en este trabajo por falta de tiempo.

5.5 *Salmonella typhimurium*

Salmonella typhimurium es una bacteria gram-negativa que actúa como un importante agente patógeno causante de gastroenteritis en seres humanos y otros mamíferos. *S. typhimurium* dispone de dos sistemas de secreción de tipo III (T3SS1 y T3SS2). Estos T3SS son complejos proteicos con forma de aguja que pueden penetrar las membranas de los

endosomas/fagosomas para inyectar toxinas efectoras en el citoplasma de las células huésped³²⁵. Tras la invasión bacteriana, las proteínas efectoras secretadas por los sistemas T3SS de *S. typhimurium* secuestran la vía endocítica de la célula huésped y convierten los endosomas/fagosomas en vacuolas de membrana sencilla, conocidas como "vacuolas que contienen Salmonella" (SCV, del inglés *Salmonella-containing vacuoles*). Estas SCVs son necesarias para la supervivencia y replicación de Salmonella³²⁶.

En los ensayos de WB realizados con *S. typhimurium*-GFP que se muestran en este trabajo, hemos observado que los MEFs TMEM59-KO infectados muestran una ligera acumulación de GFP con respecto a las células WT a 2, 4 y 6 horas tras la infección (Figuras 41, 42 y 43). Sin embargo, en los MEFs transducidos con TMEM59-HA (WT y 4M) hay muy poca acumulación de GFP respecto a los MEFs WT y KO a los mismos tiempos indicados anteriormente (Figuras 41, 42 y 43). No se han podido hacer experimentos a tiempos más largos ya que Salmonella es una bacteria muy agresiva y las células acaban perdiendo viabilidad debido a la inducción de apoptosis. Esto afecta sobre todo las células deficientes en TMEM59 ya que las células recuperadas con esta molécula presentan mejor resistencia frente a las bacterias. Esta mayor resistencia es visible tras 24 horas: en estas condiciones los MEFs WT y KO están completamente lisados por las bacterias mientras que, los MEFs restaurados con TMEM59 mantienen una viabilidad del 50-60 % (datos no mostrados). En este caso sería interesante hacer ensayos de infección y medir directamente la viabilidad de las diferentes líneas de MEFs mediante citometría de flujo.

Cabe mencionar que estudios recientes indican que el daño de la membrana de las SCVs por T3SS-1 permite que aproximadamente el 20 % de *S. typhimurium* escape al citosol entre 2 y 4 horas después la infección, donde puede replicarse a altas tasas en un fenómeno denominado "hiper-replicación" que está favorecido por el entorno rico en nutrientes^{327,328}.

La presencia de *S. typhimurium* en el citosol puede inducir autofagia defensiva a través de dos vías. La primera vía consiste en el marcaje de *S. typhimurium* con ubiquitina de forma que las proteínas adaptadoras de autofagia pueden reclutarlas hacia los autofagosomas mediante su unión a LC3. Este evento alcanza su punto máximo 1 hora después del inicio de la infección y dura solo hasta las 3 horas después de la infección³²⁹. La segunda vía es inducida por los

poros formados en los endosomas por el sistema T3SS1 y a la proliferación de la bacteria en el citoplasma, lo cual produce una depleción de aminoácidos de la célula y la inducción de estrés agudo por inanición. La inanición de aminoácidos conduce a la activación transitoria de AMPK y la inactivación de mTOR, lo que desencadena el inicio de la autofagia^{329,330}. De hecho, otros estudios han reportado que la autofagia inducida por *S. typhimurium* permite que las bacterias obtengan nutrientes y se repliquen de manera más efectiva³³¹. No obstante, la autofagia inducida por Salmonella es temporal y ocurre principalmente en las primeras etapas de la infección³²⁹.

Teniendo en cuenta este conjunto de estudios previamente publicados, nuestros resultados sugieren que los MEFs KO transducidos con TMEM59-HA restringen la proliferación de la bacteria (Figuras 41, 42 y 43) y esto podría provocar una disminución de la autofagia inducida por las bacterias revelada por menores niveles de LC3-II en estas células (Figuras 44, 45 y 46). En cambio, en los MEFs WT y KO la acumulación de Salmonella posiblemente conduce a la inducción de la autofagia canónica por las vías descritas más arriba, explicando el incremento de LC3-II observado en estas células (Figuras 44, 45 y 46).

Los ensayos de inmunofluorescencia obtenidos en este trabajo de tesis muestran que las vesículas de TMEM59 presentan una interacción relativamente baja con la bacteria a las 2 horas de infección, y esta interacción ocurre solo con bacterias aisladas y con mucha menos frecuencia en comparación con las bacterias gram positivas (Figura 47A). Esta interacción va en aumento a tiempos más tardíos. A partir de 4 y 8 horas las vesículas de TMEM59 acuden a *S. typhimurium* aisladas y a las que están agrupadas (Figuras 47B, 48), sugiriendo que las vesículas de TMEM59-positivas reconocen a las bacterias citosólicas y posiblemente a las que están en SCVs con las membranas dañadas, ya que estudios recientes han demostrado que solo las bacterias citosólicas y las que están en SCVs con la membrana dañada son reconocidas por el sistema de autofagia al principio de la infección^{332,333} (véase 1.5 Xenofagia y Figura 5). Adicionalmente, esta interacción de vesículas TMEM59 con las bacterias se hace aún más evidente entre las 4 y las 16 horas después la infección (Figuras 47B, 48 y 49). En este caso, las vesículas de TMEM59 incluso parecen contener trazas de GFP de Salmonella (Figura 49), lo que sugiere de nuevo que las vesículas de TMEM59 degradan a las bacterias. Estos datos son consistentes que con los resultados de WB anti-GFP descritos con anterioridad, en los que se

observó que los MEFs KO recuperados con TMEM59-HA presentan menores niveles de *S. typhimurium*-GFP.

Por otra parte, conviene señalar que *S. Typhimurium* ha desarrollado varios mecanismos de supervivencia para prevenir la degradación por autofagia³³⁴⁻³³⁸ que entran en funcionamiento a tiempos tardíos (a partir de 6 horas de infección). En ese momento se observa un incremento de bacterias citosólicas³³⁹⁻³⁴¹, que es cuando la actividad de las vesículas de TMEM59 se incrementa para secuestrar a la bacteria. Estos resultados son en su conjunto similares a los obtenidos con las cepas gram-positivas, sugiriendo que estos eventos en los que está involucrado TMEM59 son comunes tanto para bacterias gram-negativas como gram-positivas.

En cuanto a los ensayos de infección *in vivo*, hemos deducido que el proceso de infección por *S. typhimurium* es más agresivo en los ratones deficientes en TMEM59 en comparación con los WT, ya que empiezan a fallecer antes (Figura 52). Estos resultados apuntan a que TMEM59 juega un papel de protección contra la infección bacteriana *in vivo*. Esta idea es también consistente con los ensayos *in vitro* en los que se observa una acumulación más alta de *S. typhimurium*-GFP en los MEFs KO para TMEM59 (Figuras 41, 42 y 43), y los experimentos de inmunofluorescencia indican que las vesículas positivas para TMEM59 probablemente degradan a las bacterias (Figura 49). Este conjunto de resultados son consistentes y coherentes entre sí, y sugieren que TMEM59 juega un papel relevante en los mecanismos de defensa contra la infección bacteriana por *S. typhimurium* tanto *in vitro* como *in vivo*.

Esta función de TMEM59 también es consistente con estudios previos del laboratorio demostrando que TMEM59 presenta un motivo que se une al dominio WD40 de ATG16L1 (véase apartado 1.6.2 Trabajo previo del laboratorio) a través del cual media la respuesta autofágica inducida contra *Staphylococcus aureus*, una actividad que se ve alterada por el alelo ATG16L1-T300A que incrementa el riesgo de sufrir la enfermedad de Crohn. Datos de otros grupos indican que *Chlamydia trachomatis* es capaz de inhibir la autofagia inducida por TMEM59, debido a que Chlamydia libera una proteína efectora CT622/TaiP que interactúa con el dominio WD40 de ATG16L1²⁹⁴. Es más, Conway et al. (2013) generaron ratones cuyas células epiteliales intestinales eran deficientes en la proteína ATG16L1. Los ratones se infectaron con

S. typhimurium y se observó que los ratones deficientes en ATG16L1 mostraron una función del sistema inmune anormal y una menor capacidad de eliminación bacteriana, en comparación con los ratones control. Estos resultados indican que la autofagia dependiente de ATG16L1 realizada por las células epiteliales intestinales ayuda a los ratones a eliminar las bacterias infectivas y prevenir infecciones sistémicas³⁴². De este conjunto de datos, junto con los resultados obtenidos en este trabajo de tesis, se puede extrapolar la idea de que la ausencia de TMEM59 podría tener consecuencias similares a los de ATG16L1 al menos en los mecanismos de defensa contra las infecciones bacterianas. Esto podría abrir nuevos enfoques y panoramas para abordar las funciones biológicas en las que están implicadas tanto ATG16L1 como TMEM59 (véase apartado 1.4 Implicación de la autofagia en la salud).

En 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, patógenos que representan una gran amenaza para la salud de los seres humanos y para los cuales se necesitan con urgencia nuevos antibióticos³⁴³. Entre esta lista de patógenos están incluidos, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella* y *Salmonella* entre otras. Asimismo, en 2019 la OMS incluyó la resistencia a los antibióticos como una de las diez principales amenazas para la salud mundial³⁴⁴. Los resultados obtenidos en relación con TMEM59 podrían ser útiles para abrir nuevos horizontes y diseñar nuevos fármacos capaces de potenciar la actividad de las vesículas TMEM59-positivas con fines terapéuticos anti-bacterianos.

5.6 *Shigella flexneri*

Shigella flexneri es un patógeno gram negativo que provoca 163 millones de episodios de enfermedad al año en todo el mundo³⁴⁵. *S. flexneri* posee un plásmido de virulencia que codifica un sistema de secreción de tipo III (T3SS), para inyectar proteínas efectoras bacterianas en la célula huésped y permitir sobrevivir al medio hostil intracelular³⁴⁶ (véase apartado 1.5.5 Manipulación de la autofagia por microorganismos invasores).

Estudios recientes han reportado que la mayor parte de la población de *S. flexneri* lisa las membranas de los endosomas/fagosomas minutos después de la invasión para escapar y replicarse en el citosol de manera más eficaz^{347,348}. Sin embargo, los ensayos de inmunofluorescencia obtenidos muestran que apenas hay interacción entre *S. flexneri* y las

vesículas TMEM59-positivas, y tampoco se observan eventos de colocalización claros entre la señal de GFP (*S. flexneri*-GFP) y la señal de TMEM59-HA en las primeras fases de infección (tiempos 0 y 6 horas) (Figuras 53 y 54). Estos resultados de *S. flexneri* son contrarios a los obtenidos para bacterias gram-positivas y *S. typhimurium*, en los que las vesículas de TMEM59 no solo interaccionan con las bacterias, sino que también las integran en su interior. Además, de forma sorprendente, los datos obtenidos mediante WB anti-GFP indican que los MEFs TMEM59-KO infectados con *S. flexneri*-GFP presentan menores niveles de GFP en comparación con los MEFs WT (Figuras 55, 56 y 57). Esta diferencia es todavía más significativa en los MEFs KO recuperados con TMEM59, en los que se observan mayores niveles de GFP bacteriana. Estos resultados sugieren que TMEM59 podría favorecer la infección por *S. flexneri*, y son contrarios a los obtenidos para *S. typhimurium* puesto que en este caso la presencia de TMEM59 parece restringir la proliferación bacteriana. Cómo TMEM59 podría favorecer la infección por *S. flexneri* no está claro, estando entre las diferentes posibilidades un hipotético efecto positivo en entrada de la bacteria o en su proliferación intracelular. En todo caso, cabe mencionar que la función que pudiera ejercer TMEM59 sobre *S. flexneri* parece depender de un mecanismo basado en la unión al dominio WD40 de ATG16L1 (véase apartado 1.6.2 Trabajo previo del laboratorio), ya que esta función disminuye en los MEFs KO recuperados con TMEM59-4M-HA, que al tener mutado el motivo funcional (4M) es incapaz de unirse a ATG16L1. En todo caso, en el contexto de *S. flexneri* parece que TMEM59 desencadena o ejerce funciones completamente opuestas a las que lleva a cabo en bacterias gram-positivas o en *S. typhimurium*.

CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bainton DF. The discovery of lysosomes. *Journal of Cell Biology*. 1981;91(3):66s-76s. doi:10.1083/JCB.91.3.66S
2. DE DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R, WATTIAUX R, APPELMANS F. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*. 1955;60(4):604-617. doi:10.1042/bj0600604
3. RL D, C DD. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol*. 1967;33(2):437-449. doi:10.1083/JCB.33.2.437
4. Essner E, Novikoff AB. LOCALIZATION OF ACID PHOSPHATASE ACTIVITY IN HEPATIC LYSOSOMES BY MEANS OF ELECTRON MICROSCOPY.
5. Straus W. ISOLATION AND BIOCHEMICAL PROPERTIES OF DROPLETS FROM THE CELLS OF RAT KIDNEY*. Published online 1954. doi:10.1016/S0021-9258(18)65693-5
6. Cohn ZA. THE FATE OF BACTERIA WITHIN PHAGOCYtic CELLS I. THE DEGRADATION OF ISOTOPICALLY LABELED BACTERIA BY POLYMORPHONUCLEAR LEUCOCYTES AND MACROPHAGES. *Journal of Experimental Medicine*. 1963;117(1):27-42. doi:10.1084/JEM.117.1.27
7. Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 2008;4(6):740-743. doi:10.4161/auto.6398
8. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 1993;333(1-2):169-174. doi:10.1016/0014-5793(93)80398-E
9. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;27:107-132. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154005

10. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-741. doi:10.1016/j.cell.2011.10.026
11. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(7):458-467. doi:10.1038/nrm2708
12. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: Molecular machinery for self-eating. *Cell Death and Differentiation*. 2005;12:1542-1552. doi:10.1038/sj.cdd.4401765
13. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal*. 2017;36(13):1811. doi:10.15252/EMBJ.201796697
14. Huber LA, Teis D. Lysosomal signaling in control of degradation pathways. *Current Opinion in Cell Biology*. 2016;39:8-14. doi:10.1016/J.CEB.2016.01.006
15. Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 2019;176(1-2):11-42. doi:10.1016/J.CELL.2018.09.048
16. Levine B; MN; VHW, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 2011 469:7330. 2011;469(7330):323-335. doi:10.1038/nature09782
17. N M, M K. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-741. doi:10.1016/J.CELL.2011.10.026
18. Feng Y; HD; YZ; KDJ, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Research* 2014 24:1. 2013;24(1):24-41. doi:10.1038/cr.2013.168
19. Lőrincz P, Juhász G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(8):2462-2482. doi:10.1016/j.jmb.2019.10.028
20. Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: Joint by a chaperone. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(15):5414-5424. doi:10.1074/jbc.R117.818237
21. Fred Dice J. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends in Biochemical Sciences*. 1990;15(8):305-309. doi:10.1016/0968-0004(90)90019-8

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

22. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell Res.* 2014;24(1):92-104. doi:10.1038/cr.2013.153
23. Kaushik S, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* 2012;22(8):407. doi:10.1016/J.TCB.2012.05.006
24. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO Journal.* 2017;36(13):1811-1836. doi:10.15252/EMBJ.201796697
25. Oku M, Sakai Y. Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays.* 2018;40(6):1800008. doi:10.1002/BIES.201800008
26. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:6. 2018;19(6):349-364. doi:10.1038/s41580-018-0003-4
27. Kaushal GP, Chandrashekar K, Juncos LA, Shah S v. biomolecules Autophagy Function and Regulation in Kidney Disease. doi:10.3390/biom10010100
28. Korolchuk VI, Menzies FM, Rubinsztein DC. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters.* 2010;584(7):1393-1398. doi:10.1016/j.febslet.2009.12.047
29. Wang CW, Klionsky DJ. The Molecular Mechanism of Autophagy. *Molecular Medicine.* 2003;9(3-4):65. Accessed July 29, 2021. /pmc/articles/PMC1430730/
30. Neefjes J; JMLM; PP; BO, Jongsma MLM, Paul P, Bakke O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* 2011 11:12. 2011;11(12):823-836. doi:10.1038/nri3084
31. Khaminets A, Behl C, Dikic I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology.* 2016;26(1):6-16. doi:10.1016/J.TCB.2015.08.010
32. Murrow L, Debnath J. Autophagy As A Stress Response And Quality Control Mechanism— Implications for Cell Injury and Human Disease. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:105. doi:10.1146/ANNUREV-PATHOL-020712-163918

33. Moscat J, Karin M, Diaz-Meco MT. p62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy. *Cell*. 2016;167(3):606. doi:10.1016/J.CELL.2016.09.030
34. Nakatogawa H. Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:8. 2020;21(8):439-458. doi:10.1038/s41580-020-0241-0
35. DJ K. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 1):7-18. doi:10.1242/JCS.01620
36. Anding AL, Baehrecke EH. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Developmental Cell*. 2017;41(1):10-22. doi:10.1016/J.DEVCEL.2017.02.016
37. Cuervo AM. Autophagy: in sickness and in health. *Trends in Cell Biology*. 2004;14(2):70-77. doi:10.1016/J.TCB.2003.12.002
38. Doherty J, Baehrecke EH. Life, death and autophagy. *Nature Cell Biology* 2018 20:10. 2018;20(10):1110-1117. doi:10.1038/s41556-018-0201-5
39. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of Pathology*. 2010;221(1):3-12. doi:10.1002/PATH.2697
40. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 1993;333(1-2):169-174. doi:10.1016/0014-5793(93)80398-E
41. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of atg proteins in autophagosome formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 2011;27:107-132. doi:10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154005
42. Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagic Processes in Yeast: Mechanism, Machinery and Regulation. *Genetics*. 2013;194(2):341-361. doi:10.1534/GENETICS.112.149013
43. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*. 2010;6(6):764. doi:10.4161/AUTO.6.6.12709

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

44. Xie Z; KDJ, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology* 2007 9:10. 2007;9(10):1102-1109. doi:10.1038/ncb1007-1102
45. Noda NN, Ohsumi Y, Inagaki F. ATG Systems from the Protein Structural Point of View. *Chemical Reviews*. 2009;109(4):1587-1598. doi:10.1021/CR800459R
46. Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*. 2007;130(1):165-178. doi:10.1016/J.CELL.2007.05.021
47. Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. <https://doi.org/101091/mbc.e07-12-1292>. 2008;19(8):3290-3298. doi:10.1091/MBC.E07-12-1292
48. Kraft C, Kijanska M, Kalie E, et al. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *The EMBO Journal*. 2012;31(18):3691-3703. doi:10.1038/EMBOJ.2012.225
49. Pankiv S, Alemu EA, Brech A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end - Directed vesicle transport. *Journal of Cell Biology*. 2010;188(2):253-269. doi:10.1083/jcb.200907015
50. McEwan DG, Popovic D, Gubas A, et al. PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins. *Molecular Cell*. 2015;57(1):39-54. doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.11.006
51. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279. doi:10.4161/AUTO.7.3.14487
52. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1101-1111. doi:10.1091/mbc.E03-09-0704
53. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual Review of Genetics*. 2009;43:67-93. doi:10.1146/annurev-genet-102808-114910

54. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*. 2010;90(4):1383-1435.
doi:10.1152/physrev.00030.2009
55. K S, Y K, T S, Y O. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells*. 2007;12(2):209-218. doi:10.1111/J.1365-2443.2007.01050.X
56. Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*. 2017;25(5):1037-1043. doi:10.1016/j.cmet.2017.04.004
57. Yu L, McPhee CK, Zheng L, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010;465(7300):942-946. doi:10.1038/nature09076
58. Liu GY; SDM, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 21:4. 2020;21(4):183-203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y
59. Dibble CC, Manning BD. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nature Cell Biology* 2013 15:6. 2013;15(6):555-564.
doi:10.1038/ncb2763
60. DG H. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8(10):774-785. doi:10.1038/NRM2249
61. Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20(7):1992.
doi:10.1091/MBC.E08-12-1249
62. Mizushima N, Klionsky DJ. Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism *.
Published online 2007. doi:10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749
63. Bar-Peled L, Sabatini DM. Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol*. 2014;24(7):400. doi:10.1016/J.TCB.2014.03.003
64. Jewell JL, Russell RC, Guan KL. Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(3):133. doi:10.1038/NRM3522

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

65. Kim J; KM; VB; GKL, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology 2011 13:2*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152
66. Tomasoni R, Mondino A. The tuberous sclerosis complex: balancing proliferation and survival. *466 Biochemical Society Transactions*. 2011;39(2). doi:10.1042/BST0390466
67. Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X. ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(18):12297. doi:10.1074/JBC.M900573200
68. Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T. *Canonical and Non-Canonical Autophagy: Variations on a Common Theme of Self-Eating?*; 2011. doi:10.1038/nrm3249
69. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of Mammalian Autophagy in Physiology and Pathophysiology. Published online 2010. doi:10.1152/physrev.00030.2009
70. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature Cell Biology 2011 13:2*. 2011;13(2):132-141. doi:10.1038/ncb2152
71. Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell*. 2008;30(2):214. doi:10.1016/J.MOLCEL.2008.03.003
72. Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*. 2011;331(6016):456. doi:10.1126/SCIENCE.1196371
73. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology 2013 15:7*. 2013;15(7):713-720. doi:10.1038/ncb2788
74. Munson MJ, Ganley IG. MTOR, PIK3C3, and autophagy: Signaling the beginning from the end. *Autophagy*. 2015;11(12):2375-2376. doi:10.1080/15548627.2015.1106668
75. Subramani JCF; S, Subramani S. Mechanistic insights into selective autophagy pathways: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2016 17:9*. 2016;17(9):537-552. doi:10.1038/nrm.2016.74

76. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, et al. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*. 2009;20(7):1981. doi:10.1091/MBC.E08-12-1248
77. Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, et al. Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of Cell Science*. 2013;126(22):5224-5238. doi:10.1242/JCS.132415
78. Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999 402:6762. 1999;402(6762):672-676. doi:10.1038/45257
79. Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, et al. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *Journal of Cell Biology*. 2010;190(4):511-521. doi:10.1083/JCB.200911141
80. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*. 2010;191(1):155-168. doi:10.1083/JCB.201002100
81. Russell RC; TY; YH; PHW; CYY; KJ; KH; NTP; DA; GKL, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature Cell Biology* 2013 15:7. 2013;15(7):741-750. doi:10.1038/ncb2757
82. Lin MG, Hurley JH. Structure and Function of the ULK1 Complex in Autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2016;39:61. doi:10.1016/J.CEB.2016.02.010
83. Polson HEJ, De Lartigue J, Rigden DJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation View supplementary material. *Autophagy*. 2010;6:506-522. doi:10.4161/auto.6.4.11863
84. Ariosa AR, Klionsky DJ. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J Mol Med (Berl)*. 2016;94(11):1217. doi:10.1007/S00109-016-1461-9
85. Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Dönnies P, Kohlbacher O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *Journal of Cell Science*. 2015;128(2):207-217. doi:10.1242/JCS.146258

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

86. Wilson MI, Dooley HC, Tooze SA. WIPI2b and Atg16L1: setting the stage for autophagosome formation. *Biochemical Society Transactions*. 2014;42(5). Accessed June 25, 2017. <http://www.biochemsoctrans.org/content/42/5/1327>
87. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5–16L1. *Molecular Cell*. 2014;55(2):238-252. doi:10.1016/j.molcel.2014.05.021
88. Simonsen A, Stenmark H. Self-eating from an ER-associated cup. *Journal of Cell Biology*. 2008;182(4):621-622. doi:10.1083/JCB.200807061
89. Lane JD, Roberts R, Ktistakis NT. Omegasomes: PI3P platforms that manufacture autophagosomes. *Essays in Biochemistry*. 2013;55(1):17-27. doi:10.1042/BSE0550017
90. Axe EL, Walker SA, Manifava M, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008;182(4):685-701. doi:10.1083/jcb.200803137
91. Nunnari MG; JRF; CG; MB; J, Friedman JR, Graham C, Babu M, Nunnari J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. <https://doi.org/101091/mbc.e13-07-0381>. 2013;24(18):2918-2931. doi:10.1091/MBC.E13-07-0381
92. Zhao YG, Zhang H. Formation and maturation of autophagosomes in higher eukaryotes: a social network. *Current Opinion in Cell Biology*. 2018;53:29-36. doi:10.1016/J.CEB.2018.04.003
93. Nishimura T, Tamura N, Kono N, et al. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains. *The EMBO Journal*. 2017;36(12):1719-1735. doi:10.15252/EMBJ.201695189
94. Karanasios E, Walker SA, Okkenhaug H, et al. Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nature Communications* 2016 7:1. 2016;7(1):1-17. doi:10.1038/ncomms12420

95. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010;141(4):656-667.
doi:10.1016/j.cell.2010.04.009
96. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*. 2010;12(8):747-757.
doi:10.1038/ncb2078
97. Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K, Rubinsztein DC. Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes. *Cell*. 2013;154(6):1285-1299.
doi:10.1016/J.CELL.2013.08.044
98. Suzuki SW, Yamamoto H, Oikawa Y, et al. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(11):3350-3355. doi:10.1073/PNAS.1421092112
99. Webber JL, Young ARJ, Tooze SA. Atg9 Trafficking in Mammalian Cells.
<http://dx.doi.org/104161/auto3419>. 2006;3(1):54-56. doi:10.4161/AUTO.3419
100. Popelka H, Klionsky DJ. Analysis of the native conformation of the LIR/AIM motif in the Atg8/LC3/GABARAP-binding proteins. *Autophagy*. 2015;11(12):2153-2159.
doi:10.1080/15548627.2015.1111503/SUPPL_FILE/KAUP_A_1111503_SM5108.ZIP
101. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, et al. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(52):37298-37302.
doi:10.1074/jbc.C700195200
102. Walczak M, Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy*. 2013;9(3):424-425. doi:10.4161/auto.22931
103. Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI, Tooze SA. WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Molecular Cell*. 2014;55(2):238. doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.05.021
104. Ploegh JH; VSL; BMK; HL, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP,

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- and Apg8L *. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(51):51841-51850.
doi:10.1074/JBC.M308762200
105. Inagaki KS; NNN; HK; YF; NM; YO; F, Noda NN, Kumeta H, et al. The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *The EMBO Journal*. 2009;28(9):1341-1350. doi:10.1038/EMBOJ.2009.80
106. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, Yoshimori T. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*. 2008;19(5):2092-2100. doi:10.1091/mbc.E07-12-1257
107. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO Journal*. 2010;29(11):1792-1802. doi:10.1038/emboj.2010.74
108. Weidberg H, Shpilka T, Shvets E, Abada A, Shimron F, Elazar Z. LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Developmental Cell*. 2011;20(4):444-454. doi:10.1016/J.DEVCEL.2011.02.006
109. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *Journal of Cell Biology*. 2016;215(6):857-874. doi:10.1083/JCB.201607039
110. Johansen SP; THC; TL; AB; JAB; HO; AØ; GB; T, Clausen TH, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy *. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(33):24131-24145.
doi:10.1074/JBC.M702824200
111. Johansen T, Lamark T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(1):80-103.
doi:10.1016/J.JMB.2019.07.016
112. Komatsu Y shin S; SW; J ichi I; TU; TF; TH; NS; AY; NM; YU; EK; KT; M, Waguri S, Iwata J ichi, et al. The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic

- Isolation Membranes in Mice. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-03-0309>. 2008;19(11):4762-4775. doi:10.1091/MBC.E08-03-0309
113. Szatmári Z, Sass M. The autophagic roles of Rab small GTPases and their upstream regulators. <https://doi.org/10.4161/auto29395>. 2014;10(7):1154-1166. doi:10.4161/AUTO.29395
114. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic*. 2008;9(4):574-587. doi:10.1111/J.1600-0854.2008.00701.X
115. Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *Journal of Cell Science*. 2016;129(23):4329-4339. doi:10.1242/JCS.196287
116. Wijdeven RH; JH; NL; JL; JK; BI; NJ, Janssen H, Nahidiazar L, et al. Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nature Communications 2016 7:1*. 2016;7(1):1-14. doi:10.1038/ncomms11808
117. Pankiv S, Alemu EA, Brech A, et al. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *Journal of Cell Biology*. 2010;188(2):253-269. doi:10.1083/JCB.200907015
118. Wang T, Li L, Hong W. SNARE proteins in membrane trafficking. *Traffic*. 2017;18(12):767-775. doi:10.1111/TRA.12524
119. Lürick A, Kümmel D, Ungermann C. Multisubunit tethers in membrane fusion. *Current Biology*. 2018;28(8):R417-R420. doi:10.1016/J.CUB.2017.12.012
120. Zaffagnini G, Martens S. Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(9):1714-1724. doi:10.1016/J.JMB.2016.02.004
121. Svenning S, Johansen T. Selective autophagy. *Essays in Biochemistry*. 2013;55(1):79-92. doi:10.1042/BSE0550079
122. Ciechanover A, Brundin P. The Ubiquitin Proteasome System in Neurodegenerative Diseases: Sometimes the Chicken, Sometimes the Egg. *Neuron*. 2003;40(2):427-446. doi:10.1016/S0896-6273(03)00606-8

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

123. Dice JF, Walker CD, Byrne B, Cardiel A. General characteristics of protein degradation in diabetes and starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(5):2093. doi:10.1073/PNAS.75.5.2093
124. JF D. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci*. 1990;15(8):305-309. doi:10.1016/0968-0004(90)90019-8
125. AM C. Chaperone-mediated autophagy: Dice's "wild" idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(8):535-541. doi:10.1038/NRM3150
126. Nakatogawa H; SK; KY; OY, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2009 10:7. 2009;10(7):458-467. doi:10.1038/nrm2708
127. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes & Development*. 2007;21(22):2861-2873. doi:10.1101/GAD.1599207
128. Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, et al. The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alfy. *Molecular Cell*. 2010;38(2):265-279. doi:10.1016/J.MOLCEL.2010.04.007
129. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, et al. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep*. 2010;11(1):45-51. doi:10.1038/embor.2009.256
130. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5909-5916. doi:10.4049/JIMMUNOL.0900441
131. Kaur J, Debnath J. Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2015;16(8):461-472. doi:10.1038/nrm4024
132. Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: The p62/SQSTM1 paradigm. *Essays in Biochemistry*. 2017;61(6):609-624. doi:10.1042/EBC20170035
133. Münch C; DI, Dikic I. Hitchhiking on selective autophagy. *Nature Cell Biology* 2018 20:2. 2018;20(2):122-124. doi:10.1038/s41556-018-0036-0

134. Hyttinen JMT, Amadio M, Viiri J, Pascale A, Salminen A, Kaarniranta K. Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases. *Ageing Research Reviews*. 2014;18:16-28. doi:10.1016/J.ARR.2014.07.002
135. Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, et al. Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochemistry International*. 2017;109:202-209. doi:10.1016/J.NEUINT.2017.02.007
136. Germain K, Kim PK. Pexophagy: A Model for Selective Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 578. 2020;21(2):578. doi:10.3390/IJMS21020578
137. Hasegawa J, Maejima I, Iwamoto R, Yoshimori T. Selective autophagy: Lysophagy. *Methods*. 2015;75:128-132. doi:10.1016/J.YMETH.2014.12.014
138. von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, et al. LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Molecular Cell*. 2012;48(3):329-342. doi:10.1016/J.MOLCEL.2012.08.024
139. Stolz A, Ernst A, Dikic I. R E V I E W Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Publishing Group*. 2014;16. doi:10.1038/ncb2979
140. Grumati P, Dikic I, Stolz A. ER-phagy at a glance. *Journal of Cell Science*. 2018;131(17). doi:10.1242/JCS.217364
141. Jin M, Klionsky DJ. Finding a ribophagy receptor. <https://doi.org/101080/1554862720181483672>. 2018;14(9):1479-1480. doi:10.1080/15548627.2018.1483672
142. Papandreou ME; TN, Tavernarakis N. Nucleophagy: from homeostasis to disease. *Cell Death & Differentiation* 2019 26:4. 2019;26(4):630-639. doi:10.1038/s41418-018-0266-5
143. Vaccaro MI. Zymophagy: Selective autophagy of secretory granules. *International Journal of Cell Biology*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/396705
144. Wang Z, Li C. Xenophagy in innate immunity: A battle between host and pathogen. *Developmental & Comparative Immunology*. 2020;109:103693. doi:10.1016/J.DCI.2020.103693

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

145. Wong E, Cuervo AM. Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010;2(12). doi:10.1101/CSHPERSPECT.A006734
146. Conway O, Akpinar HA, Rogov V v., Kirkin V. Selective Autophagy Receptors in Neuronal Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(8):2483-2509. doi:10.1016/J.JMB.2019.10.013
147. Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, et al. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes to Cells*. 2008;13(12):1211-1218. doi:10.1111/J.1365-2443.2008.01238.X
148. Birgisdottir ÁB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif – crucial for selective autophagy. *Journal of Cell Science*. 2013;126(15):3237-3247. doi:10.1242/JCS.126128
149. Wild P, McEwan DG, Dikic I. The LC3 interactome at a glance. *Journal of Cell Science*. 2014;127(1):3-9. doi:10.1242/JCS.140426
150. Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, Elazar Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology* 2011 12:7. 2011;12(7):1-11. doi:10.1186/GB-2011-12-7-226
151. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology*. 2014;16(6):495-501. doi:10.1038/ncb2979
152. Mancias JD, Kimmelman AC. Mechanisms of Selective Autophagy in Normal Physiology and Cancer. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(9):1659-1680. doi:10.1016/J.JMB.2016.02.027
153. Kirkin V, Rogov V V. A Diversity of Selective Autophagy Receptors Determines the Specificity of the Autophagy Pathway. *Molecular Cell*. 2019;76(2):268-285. doi:10.1016/J.MOLCEL.2019.09.005
154. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):163-181. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.019

155. Kroemer LG; OK; CTH; G, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial Control of Cellular Life, Stress, and Death. *Circulation Research*. 2012;111(9):1198-1207. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268946
156. Yoo SM, Jung YK. A Molecular Approach to Mitophagy and Mitochondrial Dynamics. *Molecules and Cells*. 2018;41(1):18-26. doi:10.14348/MOLCELLS.2018.2277
157. Choudhury AR, Singh KK. Mitochondrial determinants of cancer health disparities. *Seminars in Cancer Biology*. 2017;47:125-146. doi:10.1016/J.SEMCANCER.2017.05.001
158. Ashrafi G, Schwarz TL. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death & Differentiation* 2013 20:1. 2012;20(1):31-42. doi:10.1038/cdd.2012.81
159. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* 2008 454:7201. 2008;454(7201):232-235. doi:10.1038/nature07006
160. Ferro F, Servais S, Besson P, Roger S, Dumas JF, Brisson L. Autophagy and mitophagy in cancer metabolic remodelling. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2020;98:129-138. doi:10.1016/J.SEMCDB.2019.05.029
161. Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, et al. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*. 2008;454(7201):232-235. doi:10.1038/nature07006
162. Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature Cell Biology* 2012 14:2. 2012;14(2):177-185. doi:10.1038/ncb2422
163. Heo JM, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular Cell*. 2015;60(1):7-20. doi:10.1016/J.MOLCEL.2015.08.016
164. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015 524:7565. 2015;524(7565):309-314. doi:10.1038/nature14893

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

165. Walden H, Muqit MMK. Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics. *Biochemical Journal*. 2017;474(9):1439-1451. doi:10.1042/BCJ20160498
166. Lamark T, Johansen T. Aggrephagy: Selective disposal of protein aggregates by macroautophagy. *International Journal of Cell Biology*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/736905
167. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature* 2003 426:6968. 2003;426(6968):884-890. doi:10.1038/nature02261
168. Winslow AR, Chen CW, Corrochano S, et al. α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *Journal of Cell Biology*. 2010;190(6):1023-1037. doi:10.1083/JCB.201003122
169. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(6):2190-2199. doi:10.1172/JCI33585
170. Ravikumar B; VC; BZ; DJE; LS; OLG; SF; EDF; DR; OCJ; RDC, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nature Genetics* 2004 36:6. 2004;36(6):585-595. doi:10.1038/ng1362
171. Croce KR, Yamamoto A. A role for autophagy in Huntington's disease. *Neurobiology of Disease*. 2019;122:16-22. doi:10.1016/J.NBD.2018.08.010
172. Hou X, Watzlawik JO, Fiesel FC, Springer W. Autophagy in Parkinson's Disease. *Journal of Molecular Biology*. 2020;432(8):2651-2672. doi:10.1016/J.JMB.2020.01.037
173. Malampati S, Song JX, Tong BCK, et al. Targeting Aggrephagy for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Cells* 2020, Vol 9, Page 311. 2020;9(2):311. doi:10.3390/CELLS9020311
174. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5909-5916. doi:10.4049/JIMMUNOL.0900441

175. Lin CY, Nozawa T, Minowa-Nozawa A, et al. Autophagy Receptor Tollip Facilitates Bacterial Autophagy by Recruiting Galectin-7 in Response to Group A Streptococcus Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2020;10. doi:10.3389/FCIMB.2020.583137
176. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature Cell Biology* 2014 16:6. 2014;16(6):495-501. doi:10.1038/ncb2979
177. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *Journal of Cell Biology*. 2005;171(4):603-614. doi:10.1083/JCB.200507002
178. Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic Levels of p62 Control Cytoplasmic Inclusion Body Formation in Autophagy-Deficient Mice. *Cell*. 2007;131(6):1149-1163. doi:10.1016/J.CELL.2007.10.035
179. Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, et al. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep*. 2014;15(5):557-565. doi:10.1002/EMBR.201338003
180. Simonsen A, Birkeland HCG, Gillooly DJ, et al. Alfyl, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *Journal of Cell Science*. 2004;117(18):4239-4251. doi:10.1242/JCS.01287
181. Fujita N, Morita E, Itoh T, et al. Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *The Journal of Cell Biology*. 2013;203(1):115. doi:10.1083/JCB.201304188
182. Verlhac P, Viret C, Faure M. Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy. <http://dx.doi.org/101080/1554862720151046672>. 2015;11(6):965-966. doi:10.1080/15548627.2015.1046672
183. Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nature Immunology* 2009 10:11. 2009;10(11):1215-1221. doi:10.1038/ni.1800

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

184. Heckmann BL, Green DR. LC3-associated phagocytosis at a glance. *Journal of Cell Science*. 2019;132(5):231472. doi:10.1242/JCS.222984/57538
185. Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450(7173):1253-1257. doi:10.1038/nature06421
186. Martinez J, Almendinger J, Oberst A, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(42):17396-17401. doi:10.1073/PNAS.1113421108
187. Underhill JM; CB; CAL; DM, Becker C, Lowell CA, Underhill DM. Dectin-1-triggered Recruitment of Light Chain 3 Protein to Phagosomes Facilitates Major Histocompatibility Complex Class II Presentation of Fungal-derived Antigens *. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(41):34149-34156. doi:10.1074/JBC.M112.382812
188. Martinez J, Verbist K, Wang R, Green DR. The Relationship between Metabolism and the Autophagy Machinery during the Innate Immune Response. *Cell Metabolism*. 2013;17(6):895-900. doi:10.1016/J.CMET.2013.05.012
189. Choi AMK, Ryter SW, Levine B. Autophagy in Human Health and Disease. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(7):651-662. doi:10.1056/NEJMRA1205406
190. Menzies FM; FA; RDC, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Neuroscience 2015 16:6*. 2015;16(6):345-357. doi:10.1038/nrn3961
191. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews Immunology 2013 13:10*. 2013;13(10):722-737. doi:10.1038/nri3532
192. McLendon PM, Ferguson BS, Osinska H, et al. Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(48):E5178-E5186. doi:10.1073/PNAS.1415589111

193. Kim J, Lim YM, Lee and MS. The Role of Autophagy in Systemic Metabolism and Human-Type Diabetes. *Molecules and Cells*. 2018;41(1):11-17. doi:10.14348/MOLCELLS.2018.2228
194. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, et al. Principles and Current Strategies for Targeting Autophagy for Cancer Treatment. *Clinical Cancer Research*. 2011;17(4):654-666. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2634
195. Winslow AR, Rubinsztein DC. Autophagy in neurodegeneration and development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2008;1782(12):723-729. doi:10.1016/J.BBADIS.2008.06.010
196. Mizushima N, Hara T. Intracellular quality control by autophagy: How does autophagy prevent neurodegeneration? *Autophagy*. 2006;2(4):302-304. doi:10.1038/nature04724
197. Wong E; CAM; CAM; CAM, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature Neuroscience* 2010 13:7. 2010;13(7):805-811. doi:10.1038/nn.2575
198. Dikic I. Proteasomal and Autophagic Degradation Systems. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>. 2017;86:193-224. doi:10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-061516-044908
199. Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004 432:7020. 2004;432(7020):1032-1036. doi:10.1038/nature03029
200. Hara T; NK; MM; YA; NY; SMR; YM; MK; SI; OH; MN, Nakamura K, Matsui M, et al. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006 441:7095. 2006;441(7095):885-889. doi:10.1038/nature04724
201. Walden H, Muqit MMK. Ubiquitin and Parkinson's disease through the looking glass of genetics. *Biochemical Journal*. 2017;474(9):1439-1451. doi:10.1042/BCJ20160498
202. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes & Development*. 2016;30(17):1913-1930. doi:10.1101/GAD.287524.116

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

203. Liang XH; JS; SM; BK; KB; HH; LB, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999 402:6762. 1999;402(6762):672-676. doi:10.1038/45257
204. Tang H, Sebti S, Titone R, et al. Decreased BECN1 mRNA Expression in Human Breast Cancer is Associated With Estrogen Receptor-Negative Subtypes and Poor Prognosis. *EBioMedicine*. 2015;2(3):255-263. doi:10.1016/J.EBIOM.2015.01.008
205. Valente G, Morani F, Nicotra G, et al. Expression and clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *BioMed Research International*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/462658
206. Rybstein MD; BSPJM; KG; GL, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L. The autophagic network and cancer. *Nature Cell Biology* 2018 20:3. 2018;20(3):243-251. doi:10.1038/s41556-018-0042-2
207. Kimmelman AC, White E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metabolism*. 2017;25(5):1037-1043. doi:10.1016/J.CMET.2017.04.004
208. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and Cancer Therapy. *Molecular Pharmacology*. 2014;85(6):830-838. doi:10.1124/MOL.114.091850
209. Rebecca VW; ARK, Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene* 2016 35:1. 2015;35(1):1-11. doi:10.1038/onc.2015.99
210. White E. The role for autophagy in cancer. *The Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(1):42-46. doi:10.1172/JCI73941
211. Yang S, Wang X, Contino G, et al. Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*. 2011;25(7):717-729. doi:10.1101/GAD.2016111
212. Guo JY, Chen HY, Mathew R, et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & Development*. 2011;25(5):460-470. doi:10.1101/GAD.2016311

213. Rosenfeldt MT; OJ; MJP; NC; MG; MA; AA; RTS; ZL; RR; APD; AKI; GE; SOJ; RKM, O'Prey J, Morton JP, et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* 2013 504:7479. 2013;504(7479):296-300. doi:10.1038/nature12865
214. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *The Lancet*. 2012;380(9853):1590-1605. doi:10.1016/S0140-6736(12)60026-9
215. Khor B; GA; XRJ, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 474:7351. 2011;474(7351):307-317. doi:10.1038/nature10209
216. Gomollón F, Dignass A, Annese V, et al. 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of Crohn's Disease 2016: Part 1: Diagnosis and Medical Management. *Journal of Crohn's and Colitis*. 2017;11(1):3-25. doi:10.1093/ECCO-JCC/JJW168
217. Ballester Ferré MP, Boscá-Watts MM, Mínguez Pérez M. Crohn's disease. *Medicina Clínica (English Edition)*. 2018;151(1):26-33. doi:10.1016/J.MEDCLE.2018.05.006
218. Khor B; GA; XRJ, Gardet A, Xavier RJ. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2011 474:7351. 2011;474(7351):307-317. doi:10.1038/nature10209
219. Benjamin JL, Sumpter R, Levine B, Hooper L v. Intestinal Epithelial Autophagy Is Essential for Host Defense against Invasive Bacteria. *Cell Host & Microbe*. 2013;13(6):723-734. doi:10.1016/J.CHOM.2013.05.004
220. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature* 2012 491:7422. 2012;491(7422):119-124. doi:10.1038/nature11582
221. Caruso R, Warner N, Inohara N, Núñez G. NOD1 and NOD2: Signaling, Host Defense, and Inflammatory Disease. *Immunity*. 2014;41(6):898-908. doi:10.1016/J.IMMUNI.2014.12.010
222. Cadwell K, Liu JY, Brown SL, et al. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* 2008 456:7219. 2008;456(7219):259-263. doi:10.1038/nature07416
223. Stappenbeck TS, Rioux JD, Mizoguchi A, et al. Crohn disease: A current perspective on genetics, autophagy and immunity. *Autophagy*. 2011;7(4):355. doi:10.4161/AUTO.7.4.13074

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

224. Boada-Romero E, Letek M, Fleischer A, Pallauf K, Ramón-Barros C, Pimentel-Muiños FX. TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *The EMBO Journal*. 2013;32(4):566-582. doi:10.1038/EMBOJ.2013.8
225. Boada-Romero E, Serramito-Gómez I, Sacristán MP, Boone DL, Xavier RJ, Pimentel-Muiños FX. The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nature Communications* 2016 7:1. 2016;7(1):1-13. doi:10.1038/ncomms11821
226. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*. 2016;14(8):e1002533. doi:10.1371/JOURNAL.PBIO.1002533
227. Kwon DH, Song HK. A Structural View of Xenophagy, a Battle between Host and Microbes. *Molecules and Cells*. 2018;41(1):27-34. doi:10.14348/MOLCELLS.2018.2274
228. Wang Z, Li C. Xenophagy in innate immunity: A battle between host and pathogen. *Developmental & Comparative Immunology*. 2020;109:103693. doi:10.1016/J.DCI.2020.103693
229. Bauckman KA, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU. Selective autophagy: Xenophagy. *Methods*. 2015;75:120-127. doi:10.1016/J.YMETH.2014.12.005
230. Mao K, Klionsky DJ. Xenophagy: A battlefield between host and microbe, and a possible avenue for cancer treatment. <https://doi.org/10.1080/1554862720161267075>. 2016;13(2):223-224. doi:10.1080/15548627.2016.1267075
231. Bauckman KA, Owusu-Boaitey N, Mysorekar IU. Selective autophagy: Xenophagy. *Methods*. 2015;75:120-127. doi:10.1016/J.YMETH.2014.12.005
232. E S. Xenophagy. *Br Dent J*. 1981;150(5):136-136. doi:10.1038/SJ.BDJ.4804559
233. Levine B. Eating Oneself and Uninvited Guests: Autophagy-Related Pathways in Cellular Defense. *Cell*. 2005;120(2):159-162. doi:10.1016/J.CELL.2005.01.005
234. Mitchell G, Isberg RR. Innate Immunity to Intracellular Pathogens: Balancing Microbial Elimination and Inflammation. *Cell Host and Microbe*. 2017;22(2):166-175. doi:10.1016/j.chom.2017.07.005

235. Huang J, Brumell JH. Bacteria-autophagy interplay: A battle for survival. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(2):101-114. doi:10.1038/nrmicro3160
236. Baxt LA, Garza-Mayers AC, Goldberg MB. Bacterial subversion of host innate immune pathways. *Science (1979)*. 2013;340(6133):697-701. doi:10.1126/SCIENCE.1235771
237. Shahnazari S, Namolovan A, Mogridge J, Kim PK, Brumell JH. Bacterial toxins can inhibit host cell autophagy through cAMP generation. <https://doi.org/10.4161/auto7916435>. 2011;7(9):957-965. doi:10.4161/AUTO.7.9.16435
238. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science (1979)*. 2005;307(5710):727-731. doi:10.1126/SCIENCE.1106036
239. Choy A, Dancourt J, Mugo B, et al. The Legionella effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science (1979)*. 2012;338(6110):1072-1076. doi:10.1126/SCIENCE.1227026
240. Chargui A, Cesaro A, Mimouna S, et al. Subversion of Autophagy in Adherent Invasive Escherichia coli-Infected Neutrophils Induces Inflammation and Cell Death. *PLOS ONE*. 2012;7(12):e51727. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0051727
241. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. Staphylococcus aureus subvert autophagy for induction of caspase-independent host cell death. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(4):2695-2706. doi:10.1074/jbc.M609784200
242. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. <https://doi.org/10.3109/088301852010529976>. 2011;30(1):16-34. doi:10.3109/08830185.2010.529976
243. Zhu Y, Deng J, Nan ML, et al. The Interplay Between Pattern Recognition Receptors and Autophagy in Inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2019;1209:79-108. doi:10.1007/978-981-15-0606-2_6

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

244. Margaritopoulos GA, Lasithiotaki I, Antoniou KM. Toll-like receptors and autophagy in interstitial lung diseases. *European Journal of Pharmacology*. 2017;808:28-34. doi:10.1016/J.EJPBAR.2016.09.032
245. Pauwels AM, Trost M, Beyaert R, Hoffmann E. Patterns, Receptors, and Signals: Regulation of Phagosome Maturation. *Trends in Immunology*. 2017;38(6):407-422. doi:10.1016/J.IT.2017.03.006
246. Klionsky DJ, Eskelinen EL, Deretic V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. <http://dx.doi.org/104161/auto28448>. 2014;10(4):549-551. doi:10.4161/AUTO.28448
247. Huang J, Canadien V, Lam GY, et al. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(15):6226-6231. doi:10.1073/PNAS.0811045106
248. Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nature Cell Biology* 2014 17:7. 2015;17(7):893-906. doi:10.1038/ncb3192
249. Inomata M, Xu S, Chandra P, et al. Macrophage LC3-associated phagocytosis is an immune defense against *Streptococcus pneumoniae* that diminishes with host aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(52):33561. doi:10.1073/PNAS.2015368117
250. Li S, Wandel MP, Li F, et al. Sterical hindrance promotes selectivity of the autophagy cargo receptor NDP52 for the danger receptor galectin-8 in antibacterial autophagy. *Science Signaling*. 2013;6(261). doi:10.1126/SCISIGNAL.2003730
251. Thurston TLM, Wandel MP, Von Muhlinen N, Foeglein Á, Randow F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature*. 2012;482(7385):414-418. doi:10.1038/nature10744
252. Denard J, Beley C, Kotin R, et al. Human Galectin 3 Binding Protein Interacts with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 6. *Journal of Virology*. 2012;86(12):6620-6631. doi:10.1128/JVI.00297-12

253. Perrin AJ, Jiang X, Birmingham CL, So NSY, Brumell JH. Recognition of Bacteria in the Cytosol of Mammalian Cells by the Ubiquitin System. *Current Biology*. 2004;14(9):806-811. doi:10.1016/J.CUB.2004.04.033
254. Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. *The Journal of Immunology*. 2009;183(9):5909-5916. doi:10.4049/JIMMUNOL.0900441
255. Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, et al. p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy. *FEBS Open Bio*. 2018;8(3):470-480. doi:10.1002/2211-5463.12385
256. Dussurget O, Pizarro-Cerda J, Cossart P. Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annual Review of Microbiology*. 2004;58:587-610. doi:10.1146/ANNUREV.MICRO.57.030502.090934
257. Dortet L, Mostowy S, Louaka AS, et al. Recruitment of the Major Vault Protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* Strategy to Avoid Autophagy. *PLoS Pathogens*. 2011;7(8). doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1002168
258. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biology* 2009 11:10. 2009;11(10):1233-1240. doi:10.1038/ncb1967
259. Lambrechts A, Gevaert K, Cossart P, Vandekerckhove J, van Troys M. *Listeria* comet tails: the actin-based motility machinery at work. *Trends in Cell Biology*. 2008;18(5):220-227. doi:10.1016/J.TCB.2008.03.001
260. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biology* 2009 11:10. 2009;11(10):1233-1240. doi:10.1038/ncb1967
261. Ogawa M, Yoshimori T, Suzuki T, Sagara H, Mizushima N, Sasakawa C. Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science (1979)*. 2005;307(5710):727-731. doi:10.1126/SCIENCE.1106036

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

262. Baxt LA, Goldberg MB. Host and Bacterial Proteins That Repress Recruitment of LC3 to Shigella Early during Infection. *PLOS ONE*. 2014;9(4):e94653. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0094653
263. Suzuki T, Miki H, Takenawa T, Sasakawa C. Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of Shigella flexneri. *The EMBO Journal*. 1998;17(10):2767-2776. doi:10.1093/EMBOJ/17.10.2767
264. Mestre MB, Fader CM, Sola C, Colombo MI. α -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in Staphylococcus aureus infected cells. <http://dx.doi.org/104161/auto6110698>. 2010;6(1):110-125. doi:10.4161/AUTO.6.1.10698
265. Schnaith A, Kashkar H, Leggio SA, Addicks K, Krönke M, Krut O. Staphylococcus aureus Subvert Autophagy for Induction of Caspase-independent Host Cell Death *. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(4):2695-2706. doi:10.1074/JBC.M609784200
266. Tattoli I, Sorbara MT, Yang C, Tooze SA, Philpott DJ, Girardin SE. Listeria phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *The EMBO Journal*. 2013;32(23):3066-3078. doi:10.1038/EMBOJ.2013.234
267. Mitchell G, Ge L, Huang Q, et al. Avoidance of autophagy mediated by PlcA or ActA is required for listeria monocytogenes growth in macrophages. *Infection and Immunity*. 2015;83(5):2175-2184. doi:10.1128/IAI.00110-15/SUPPL_FILE/ZII999091226SO1.PDF
268. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science (1979)*. 2004;306(5698):1037-1040. doi:10.1126/SCIENCE.1103966
269. Sakurai A, Maruyama F, Funao J, et al. Specific behavior of intracellular Streptococcus pyogenes that has undergone autophagic degradation is associated with bacterial streptolysin O and host small G proteins Rab5 and Rab7. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(29):22666-22675. doi:10.1074/JBC.M109.100131/ATTACHMENT/0BAF2A14-67A8-4278-A35D-84CBC977BBE1/MMC1.ZIP
270. Barnett TC, Liebl D, Seymour LM, et al. The globally disseminated M1T1 clone of group a streptococcus evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host and Microbe*.

- 2013;14(6):675-682. doi:10.1016/J.CHOM.2013.11.003/ATTACHMENT/FAE401AA-3C90-4B77-A1B9-BBF2F17DA138/MMC1.PDF
271. Campbell-Valois FX, Sachse M, Sansonetti PJ, Parsot C. Escape of actively secreting shigella flexneri from ATG8/LC3-Positive vacuoles formed during cell-to-cell spread is facilitated by IcsB and VirA. *mBio*. 2015;6(3):1-11. doi:10.1128/MBIO.02567-14/ASSET/82E3E7C5-F8CA-4FE4-970A-1B29DBA659CA/ASSETS/GRAPHIC/MBO0031523360001.JPEG
272. Chu Y, Gao S, Wang T, et al. A novel contribution of spvB to pathogenesis of Salmonella Typhimurium by inhibiting autophagy in host cells. *Oncotarget*. 2016;7(7):8295-8309. doi:10.18632/ONCOTARGET.6989
273. Wen T, Gu P, Chen F. Discovery of two novel functional genes from differentiation of neural stem cells in the striatum of the fetal rat. *Neuroscience Letters*. 2002;329(1):101-105. doi:10.1016/S0304-3940(02)00585-2
274. Zhang L, Ju X, Cheng Y, Guo X, Wen T. Identifying Tmem59 related gene regulatory network of mouse neural stem cell from a compendium of expression profiles. *BMC Systems Biology* 2011 5:1. 2011;5(1):1-12. doi:10.1186/1752-0509-5-152
275. Li X, Feng R, Huang C, et al. MicroRNA-351 regulates TMEM 59 (DCF1) expression and mediates neural stem cell morphogenesis. <http://dx.doi.org/104161/rna19100>. 2012;9(3):292-301. doi:10.4161/RNA.19100
276. Wang L, Wang J, Wu Y, et al. A Novel Function of dcf1 During the Differentiation of Neural Stem Cells In vitro. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2008 28:6. 2008;28(6):887-894. doi:10.1007/S10571-008-9266-1
277. Liu Q, Chen Y, Li Q, Wu L, Wen T. Dcf1 regulates neuropeptide expression and maintains energy balance. *Neuroscience Letters*. 2017;650:1-7. doi:10.1016/J.NEULET.2017.03.052
278. Liu Q, Feng R, Chen Y, et al. Dcf1 Triggers Dendritic Spine Formation and Facilitates Memory Acquisition. *Molecular Neurobiology* 2016 55:1. 2017;55(1):763-775. doi:10.1007/S12035-016-0349-6

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

279. Ullrich S, Münch A, Neumann S, Kremmer E, Tatzelt J, Lichtenthaler SF. The Novel Membrane Protein TMEM59 Modulates Complex Glycosylation, Cell Surface Expression, and Secretion of the Amyloid Precursor Protein *. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(27):20664-20674. doi:10.1074/JBC.M109.055608
280. Liu Z, Ning J, Zheng X, et al. TMEM59 interacts with TREM2 and modulates TREM2-dependent microglial activities. *Cell Death & Disease* 2020 11:8. 2020;11(8):1-14. doi:10.1038/s41419-020-02874-3
281. van Meir EG, Costas ;, Hadjipanayis G, et al. Exciting New Advances in Neuro-Oncology The Avenue to a Cure for Malignant Glioma. Published online 2010. doi:10.3322/caac.20069
282. Chen J, Li Y, Yu TS, et al. A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* 2012 488:7412. 2012;488(7412):522-526. doi:10.1038/nature11287
283. Xie Y, Li Q, Yang Q, et al. Overexpression of DCF1 inhibits glioma through destruction of mitochondria and activation of apoptosis pathway. *Scientific Reports* 2014 4:1. 2014;4(1):1-7. doi:10.1038/srep03702
284. Luo G, Feng R, Sun Y, et al. Dendritic cell factor 1 inhibits proliferation and migration and induces apoptosis of neuroblastoma cells by inhibiting the ERK signaling pathway. *Oncology Reports*. 2019;41(1):103-112. doi:10.3892/OR.2018.6796/HTML
285. Meng J, Han L, Zheng N, et al. TMEM59 Haploinsufficiency Ameliorates the Pathology and Cognitive Impairment in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2020;0:1191. doi:10.3389/FCELL.2020.596030
286. Guttula SV, Allam A, Gumpeny RS. Analyzing microarray data of Alzheimer's using cluster analysis to identify the biomarker genes. *International Journal of Alzheimer's Disease*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/649456
287. Bakulski KM, Dolinoy DC, Sartor MA, et al. Genome-Wide DNA Methylation Differences Between Late-Onset Alzheimer's Disease and Cognitively Normal Controls in Human Frontal Cortex. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2012;29(3):571-588. doi:10.3233/JAD-2012-111223

288. Lichtenthaler SU; AM; SN; EK; JT; SF, Münch A, Neumann S, Kremmer E, Tatzelt J, Lichtenthaler SF. The Novel Membrane Protein TMEM59 Modulates Complex Glycosylation, Cell Surface Expression, and Secretion of the Amyloid Precursor Protein *. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(27):20664-20674. doi:10.1074/JBC.M109.055608
289. Li W, Li Y, Gan L, Ma F, Zhang S, Wen T. Dcf1 alleviates C99-mediated deficits in drosophila by reducing the cleavage of C99. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2020;530(2):410-417. doi:10.1016/J.BBRC.2020.05.063
290. Kong Y, Wang J, Li J, et al. Tmem59 deletion activates microglia and reduces phagocytic capacity. *Journal of Nuclear Medicine*. 2019;60(supplement 1).
291. Liu Z; NJ; ZX; MJ; HL; ZH; ZL; CXF; ZX; LH; CD; XH; ZY wu, Ning J, Zheng X, et al. TMEM59 interacts with TREM2 and modulates TREM2-dependent microglial activities. *Cell Death & Disease* 2020 11:8. 2020;11(8):1-14. doi:10.1038/s41419-020-02874-3
292. Guttula SV, Allam A, Gumpeny RS. Analyzing microarray data of Alzheimer's using cluster analysis to identify the biomarker genes. *International Journal of Alzheimer's Disease*. Published online 2012. doi:10.1155/2012/649456
293. Alcalá S; KM; FJ; FA; PMFX, Klee M, Fernández J, Fleischer A, Pimentel-Muiños FX. A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* 2008 27:1. 2007;27(1):44-54. doi:10.1038/sj.onc.1210600
294. Hamaoui D, Cossé MM, Mohan J, Lystad AH, Wollert T, Subtil A. The Chlamydia effector CT622/TaiP targets a nonautophagy related function of ATG16L1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(43):26784. doi:10.1073/PNAS.2005389117
295. Pelletier S, Gingras S, Green DR. Mouse Genome Engineering via CRISPR-Cas9 for Study of Immune Function. *Immunity*. 2015;42(1):18-27. doi:10.1016/J.IMMUNI.2015.01.004/ATTACHMENT/5ABD046D-41A8-4627-856A-5F8B9CBCB466/MMC1.PDF

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

296. Jat PS, Cepko CL, Mulligan RC, Sharp' PA. Recombinant retroviruses encoding simian virus 40 large T antigen and polyomavirus large and middle T antigens. *Molecular and Cellular Biology*. 1986;6(4):1204-1217. doi:10.1128/MCB.6.4.1204-1217.1986
297. Green N, Alexander H, Olson A, et al. Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell*. 1982;28(3):477-487. doi:10.1016/0092-8674(82)90202-1
298. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(12):7877-7882. doi:10.1073/PNAS.082243699
299. Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. Crystal Structure of the Aequorea victoria Green Fluorescent Protein. *Science (1979)*. 1996;273(5280):1392-1395. doi:10.1126/SCIENCE.273.5280.1392
300. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 1996;173(1):33-38. doi:10.1016/0378-1119(95)00685-0
301. Carapetis JR, Steer AC, Mulholland EK, Weber M. The global burden of group A streptococcal diseases. *The Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(11):685-694. doi:10.1016/S1473-3099(05)70267-X
302. Yamaguchi H, Nakagawa I, Yamamoto A, Amano A, Noda T, Yoshimori T. An initial step of gas-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7. *PLoS Pathogens*. 2009;5(11):1-9. doi:10.1371/journal.ppat.1000670
303. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science (1979)*. 2004;306(5698):1037-1040. doi:10.1126/SCIENCE.1103966/SUPPL_FILE/NAKAGAWA.SOM.PDF
304. Barnett TC, Liebl D, Seymour LM, et al. The globally disseminated M1T1 clone of group a streptococcus evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host and Microbe*. 2013;14(6):675-682. doi:10.1016/J.CHOM.2013.11.003/ATTACHMENT/FAE401AA-3C90-4B77-A1B9-BBF2F17DA138/MMC1.PDF

305. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics* 2006 39:2. 2006;39(2):207-211. doi:10.1038/ng1954
306. Zhao Q, Gao SM, Wang MC. Molecular Mechanisms of Lysosome and Nucleus Communication. *Trends in Biochemical Sciences*. 2020;45(11):978-991. doi:10.1016/J.TIBS.2020.06.004
307. Klionsky DJ, Eskelinen EL. The vacuole vs. the lysosome. <https://doi.org/10.4161/auto27367>. 2013;10(2):185-187. doi:10.4161/AUTO.27367
308. Schulze RJ, Krueger EW, Weller SG, et al. Direct lysosome-based autophagy of lipid droplets in hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(51):32443-32452. doi:10.1073/PNAS.2011442117
309. Maurer K, Reyes-Robles T, Alonzo F, Durbin J, Torres VJ, Cadwell K. Autophagy Mediates Tolerance to Staphylococcus aureus Alpha-Toxin. *Cell Host Microbe*. 2015;17(4):429. doi:10.1016/J.CHOM.2015.03.001
310. Turner NA, Sharma-Kuinkel BK, Maskarinec SA, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: an overview of basic and clinical research. *Nature Reviews Microbiology* 2019 17:4. 2019;17(4):203-218. doi:10.1038/s41579-018-0147-4
311. Costa FN, Belo NO, Costa EA, et al. Frequency of enterotoxins, toxic shock syndrome toxin-1, and biofilm formation genes in Staphylococcus aureus isolates from cows with mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 2018;50(5):1089-1097. doi:10.1007/S11250-018-1534-6/FIGURES/2
312. Nakagawa I. Streptococcus pyogenes Escapes from Autophagy. *Cell Host & Microbe*. 2013;14(6):604-606. doi:10.1016/J.CHOM.2013.11.012
313. Lu SL, Kawabata T, Cheng YL, et al. Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of Streptococcus pyogenes. *PLOS Pathogens*. 2017;13(7):e1006444. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1006444

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

314. Radoshevich L, Cossart P. *Listeria monocytogenes*: towards a complete picture of its physiology and pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2017 16:1. 2017;16(1):32-46. doi:10.1038/nrmicro.2017.126
315. Vdovikova S, Luhr M, Szalai P, et al. A novel role of *Listeria monocytogenes* membrane vesicles in inhibition of autophagy and cell death. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2017;7(MAY). doi:10.3389/FCIMB.2017.00154/FULL
316. Tattoli I, Sorbara MT, Yang C, Tooze SA, Philpott DJ, Girardin SE. *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *The EMBO Journal*. 2013;32(23):3066-3078. doi:10.1038/EMBOJ.2013.234
317. Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. Autophagy targeting of *Listeria monocytogenes* and the bacterial countermeasure. <http://dx.doi.org/104161/auto7314581>. 2011;7(3):310-314. doi:10.4161/AUTO.7.3.14581
318. Tattoli I, Sorbara MT, Philpott DJ, Girardin SE. Stalling autophagy: a new function for *Listeria* phospholipases. *Microbial Cell*. 2014;1(1):48. doi:10.15698/MIC2014.01.124
319. Cemma M, Lam GY, Stöckli M, Higgins DE, Brumell JH. Strain-Specific Interactions of *Listeria monocytogenes* with the Autophagy System in Host Cells. *PLOS ONE*. 2015;10(5):e0125856. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0125856
320. Py BF, Lipinski MM, Yuan J. Autophagy Limits *Listeria monocytogenes* Intracellular Growth in the Early Phase of Primary Infection. <http://dx.doi.org/104161/auto3618>. 2006;3(2):117-125. doi:10.4161/AUTO.3618
321. Dortet L, Mostowy S, Louaka AS, et al. Recruitment of the Major Vault Protein by InlK: A *Listeria monocytogenes* Strategy to Avoid Autophagy. *PLOS Pathogens*. 2011;7(8):e1002168. doi:10.1371/JOURNAL.PPAT.1002168
322. Birmingham CL, Canadien V, Gouin E, et al. *Listeria monocytogenes* Evades Killing by Autophagy During Colonization of Host Cells. <https://doi.org/104161/auto4450>. 2007;3(5):442-451. doi:10.4161/AUTO.4450

323. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, et al. *Listeria monocytogenes* ActA-mediated escape from autophagic recognition. *Nature Cell Biology* 2009 11:10. 2009;11(10):1233-1240. doi:10.1038/ncb1967
324. Mitchell G, Ge L, Huang Q, et al. Avoidance of autophagy mediated by PlcA or ActA is required for *Listeria monocytogenes* growth in macrophages. *Infection and Immunity*. 2015;83(5):2175-2184. doi:10.1128/IAI.00110-15/SUPPL_FILE/ZII999091226SO1.PDF
325. Figueira R, Watson KG, Holden DW, Helaine S. Identification of *Salmonella* Pathogenicity Island-2 Type III Secretion System Effectors Involved in Intramacrophage Replication of *S. enterica* Serovar Typhimurium: Implications for Rational Vaccine Design. *mBio*. 2013;4(2). doi:10.1128/MBIO.00065-13
326. Steele-Mortimer O. The *Salmonella*-containing vacuole—Moving with the times. *Current Opinion in Microbiology*. 2008;11(1):38-45. doi:10.1016/J.MIB.2008.01.002
327. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls *Salmonella* infection in response to damage to the *Salmonella*-containing vacuole. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(16):11374-11383. doi:10.1074/JBC.M509157200/ATTACHMENT/FFFFFF381-E431-485E-805C-519C67846E63/MMC1.ZIP
328. Malik-Kale P, Winfree S, Steele-Mortimer O. The Bimodal Lifestyle of Intracellular *Salmonella* in Epithelial Cells: Replication in the Cytosol Obscures Defects in Vacuolar Replication. *PLOS ONE*. 2012;7(6):e38732. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0038732
329. Tattoli I, Sorbara MT, Vuckovic D, et al. Amino acid starvation induced by invasive bacterial pathogens triggers an innate host defense program. *Cell Host and Microbe*. 2012;11(6):563-575. doi:10.1016/J.CHOM.2012.04.012/ATTACHMENT/3FA345E2-3EC7-4B4C-BA0D-7691AFC2F3A0/MMC1.PDF
330. Mostowy S. Autophagy and bacterial clearance: a not so clear picture. *Cellular Microbiology*. 2013;15(3):395-402. doi:10.1111/CMI.12063

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

331. Yu HB, Croxen MA, Marchiando AM, et al. Autophagy facilitates Salmonella replication in HeLa cells. *mBio*. 2014;5(2). doi:10.1128/MBIO.00865-14/SUPPL_FILE/MBO001141765ST1.DOC
332. Perrin AJ, Jiang X, Birmingham CL, So NSY, Brumell JH. Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Current Biology*. 2004;14(9):806-811. doi:10.1016/J.CUB.2004.04.033/ATTACHMENT/F07086AA-5F12-4375-BBF0-1D2F61F57230/MMC1.PDF
333. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(16):11374-11383. doi:10.1074/JBC.M509157200/ATTACHMENT/FFFFFF381-E431-485E-805C-519C67846E63/MMC1.ZIP
334. Wang L, Li Y, Liu Y, et al. Salmonella spv locus affects type I interferon response and the chemotaxis of neutrophils via suppressing autophagy. *Fish & Shellfish Immunology*. 2019;87:721-729. doi:10.1016/J.FSI.2019.02.009
335. Wen X, Klionsky DJ. How bacteria can block xenophagy: an insight from Salmonella. <https://doi.org/101080/1554862720191666580>. 2019;16(2):193-194. doi:10.1080/15548627.2019.1666580
336. Xu Y, Zhou P, Cheng S, et al. A Bacterial Effector Reveals the V-ATPase-ATG16L1 Axis that Initiates Xenophagy. *Cell*. 2019;178(3):552-566.e20. doi:10.1016/J.CELL.2019.06.007/ATTACHMENT/47553878-3113-4936-85DE-B020A8D77515/MMC3.XLSX
337. Feng ZZ, Jiang AJ, Mao AW, et al. The Salmonella effectors SseF and SseG inhibit Rab1A-mediated autophagy to facilitate intracellular bacterial survival and replication. *Journal of Biological Chemistry*. 2018;293(25):9662-9673. doi:10.1074/JBC.M117.811737/ATTACHMENT/24C7A893-8075-4377-8863-6308E13C84B9/MMC1.PDF

338. Jiao Y, Zhang YG, Lin Z, et al. Salmonella Enteritidis Effector AvrA Suppresses Autophagy by Reducing Beclin-1 Protein. *Frontiers in Immunology*. 2020;11:686. doi:10.3389/FIMMU.2020.00686/BIBTEX
339. Birmingham CL, Smith AC, Bakowski MA, Yoshimori T, Brumell JH. Autophagy controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(16):11374-11383. doi:10.1074/JBC.M509157200/ATTACHMENT/FFFFFF381-E431-485E-805C-519C67846E63/MMC1.ZIP
340. Thurston TLM; RG; BS; von MN; RF, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N, Randow F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nature Immunology* 2009 10:11. 2009;10(11):1215-1221. doi:10.1038/ni.1800
341. Birmingham CL, Brumell JH. Autophagy Recognizes Intracellular Salmonella enterica serovar Typhimurium in Damaged Vacuoles. <http://dx.doi.org/104161/auto2825>. 2006;2(3):156-158. doi:10.4161/AUTO.2825
342. Conway KL, Kuballa P, Song JH, et al. Atg16l1 is Required for Autophagy in Intestinal Epithelial Cells and Protection of Mice from Salmonella Infection. *Gastroenterology*. 2013;145(6):1347-1357. doi:10.1053/J.GASTRO.2013.08.035
343. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020;25(6). doi:10.3390/MOLECULES25061340
344. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial antibiotic resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 2021;10(10). doi:10.3390/PATHOGENS10101310/S1
345. Lima IFN, Havt A, Lima AAM. Update on molecular epidemiology of Shigella infection. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2015;31(1):30-37. doi:10.1097/MOG.000000000000136
346. Ogawa M, Handa Y, Ashida H, Suzuki M, Sasakawa C. The versatility of Shigella effectors. *Nature Reviews Microbiology* 2007 6:1. 2008;6(1):11-16. doi:10.1038/nrmicro1814

347. Fredlund J, Enninga J. Cytoplasmic access by intracellular bacterial pathogens. *Trends in Microbiology*. 2014;22(3):128-137. doi:10.1016/J.TIM.2014.01.003
348. Ray K, Marteyn B, Sansonetti PJ, Tang CM. Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:5. 2009;7(5):333-340. doi:10.1038/nrmicro2112

AGRADECIMIENTOS

8 Agradecimientos

Gracias a todas las personas que han contribuido a que este trabajo haya salido adelante. A todos los que me han ayudado a crecer tanto intelectual como personalmente. Gracias.

Gracias a Felipe. Gracias por haberme enseñado hacer ciencia con rigor y claridad. Gracias por haberme dado la oportunidad de emprender este trabajo. Gracias por el tiempo dedicado y los conocimientos brindados. A los miles de preguntas que te hice y por las discusiones científicas.

Gracias a María y Avelino por vuestros consejos, ayuda y ánimo que me habéis dado a lo largo de estos años de máster y tesis.

Gracias a Rogelio por haberme transmitido la pasión por la biología molecular desde el primer año de carrera. Por tus consejos y ánimos que me has dado en los años de máster y tesis.

Gracias a mis compañeros del laboratorio por la ayuda y por todo lo que me habéis enseñado. A Inma y Raquel por enseñarme el funcionamiento del laboratorio. A José Luís por todos tus consejos, los ratos del almuerzo y conocimientos de posdoc. A Álvaro por todas aquellas lecciones de inglés. A Elena, Claudia y Angela por ser unas grandes compañeras del pasillo 3. Gracias a todo el personal de servicios de CIC, Especialmente al servicio de Microscopía, Ana, Ángel y Sara. A Marga de secretaria, Sonia y Eugenia de almacén, Rosario y Ana de Cocina, Carlos de Mantenimiento.

Gracias al grado de Química porque me dio la oportunidad de conocer a personas excepcionales. Especialmente a Pablo, Alejandro, Ignacio, Sara, Alvaros, Angela, Patricia, Andrea, Elena y Martas. Al grupo de Quino, Omayra, Laura, Sara, José, Fran y Ángel. A Omayra por el último empujón para acabar. A Davids, Villa y Eva.

Gracias a Quino por transmitirme el arte de hacer ciencia. A Jesús por tu arte de enseñar la ciencia.

Gràcies als professors centre d'educació bàsica d'adults Andorra. Especialment a Ramon, Marta, Rosa, Meri i Josep Maria.

Gracias a Tálida por haberme aceptado y por toda la ayuda. A Enrique, Paco, Meri, Pepa, Amparo y Teresa del instituto de Andorra.

Gracias a todos mis amigos escaladores de Salamanca. En particular Sonia, Ana madre, a mi sensei (José), Luna, JJ, Ángel, Raúl, Juan, Brillan, Elena, al presidente (Javi), Garrote, Tano, Turra, Bellota, Alberto (info), Andrés y David (Burgos).

Merci à ma syster Cami d'être une personne super courageuse, forte, heureuse et de m'avoir fait voir la vie différemment. Pour m'avoir encouragé à entrer dans le monde de la biologie moléculaire et pour ton aide pour terminer cette étape. A mon grand ami grimpeur Zafran pour tes conseils pour flirter efficacement. À Elaya d'être venue au monde un peu plus tôt pour assister à ma thèse. A Cristina por tu ayuda y ánimos.

Gracias a mis Amigas de Madrid, Susana, Lourdes e Inma por vuestro apoyo, ánimos y por vuestra gran hospitalidad por Madrid.

Grazas aos meus amigos de Galicia, Jonatan e Dani, por todo o que fixestes por min na primeira etapa da miña formación.

Thanks to Romo, my big brother, for always being there to celebrate my achievements as well as in the most critical situations of my life. For all those concerts, adventures in the mountains or trips around the world that have greatly benefited me to recharge my strength and vitality to achieve my goals. Your greatness always amazes me.

Gracias María por obligarme a salir de la biblioteca o del laboratorio para pasar unos momentos geniales en el Rastrel. Por tus consejos y apoyo. Por recordarme que no todo es ciencia.

Gracias a Jana Yoga por esas clases de yoga. Por compartir tus conocimientos de geología. Por tu apoyo y ayuda.

Eskerrik asko Iñigo de San Sebastián. Salamancan elkartu zen lehen pertsona izateagatik eta orduz geroztik adiskidetasun handia ezarri izanagatik. Pentsalari bikaina izateagatik,

8 AGRADECIMIENTOS

guztiarekin kritikoa eta zure ezagutza partekatzeagatik. Hitzaldi filosofiko guzti horiengatik. Zure gainditzearen adibideagatik eta zure laguntzagatik.

Gracias a Cristina de Asturias por ser de las pocas personas que puedo estar horas y horas hablando y entendernos perfectamente. Por tu buena hospitalidad por Asturias. Por tu apoyo y ánimos.

Thanks to my friend Erika from the USA, for all the time we shared and for the interesting conversations. For always being attentive and for your support. For helping me improve my English.

Gracias a Rachid, Jaouad, Mustafa, Salih, Yasin y Karim de Andorra por vuestros ánimos y apoyo.

Gracias a al centro cultural islámico y la asociación de Averroes de Andorra por toda la ayuda.

Gràcies a la meva Dra. Marta, per la teva ajuda i per tot el que has fet per mi. Pel teu suport i ànims que m'has donat durant aquests anys. Els teus missatges sempre m'han apartat una dosi enorme d'energia per enfrontar totes aquestes dures etapes.

Gràcies a la Rosa per tot allò que m'has ensenyat, aportat, ajudat i molt més. Sense dubte, no hauria aconseguit aquesta meta sense les bases i esforç que vas posar des del primer moment que t'he conegut. Per conèixer unes persones increïbles com Salvi, Eduard i Josep que són com la meva família de la Seu d'Urgell.

Gràcies a la Rosa per haver estat una secretària excepcional i haver lluitat amb la Marisa contra el sistema per donar-me accés a l'educació. Avui aquest èxit és part de tota l'ajuda brindada des del primer instant que t'he conegut. A Bea per la gran persona y por los ánimos que me has dado de manera continua. A Mari Creu per tota la teva gran saviesa compartida a les meves estones per la biblioteca. A Aurora por esa bonita sonrisa tan contagiosa.

Gracias a David y Omar, los mejores senseis de taekwondo y por haberme enseñado a tener buena disciplina.

Gracias a los Najims, por haberme integrado en su núcleo. Especialmente a Mohamade por ser una persona ejemplar, por haberme inspirado y ayudado a dar mí primer paso en el mundo académico, ese paso ha sido muy difícil y relevante para poder dar los siguientes. Por tus valiosos consejos. A Fared por ser un gran amigo y hermano a la vez y poder contar contigo con cualquier cosa. Por toda la ayuda y ánimos que me has dado a lo largo de estos años. A Baghdad por ser un de las personas de mayor confianza a pesar de vernos muy poco. Al tío Mohamed por su bondad, generosidad y un gran maestro. A Maanan y Tamaanant por haberme ayudado cuando más lo necesitaba. A Abdelkader, Mimoun, Fouad, Fatiha, Karim, Omar y Hassan por demostrarme que siempre estáis dispuestos para ayudar en todo y por vuestros ánimos.

Gracias a mí familia Salmantina. Los comienzos nunca son sencillos, pero se simplifican enormemente si cuentas con personas que te invitan a superar cada barrera y te ayudan a alcanzar tus metas. Especialmente a Marisa y Rafael por ser mis padres adoptivos y por haberme dado un hogar para emprender y lograr todas mis metas académicas. Por haberme acompañado en todas mis etapas de formación y aprendizaje. A Rafa, Luis y Elena por haberme hecho sentir como uno más de vosotros y por todo lo que me habéis aportado. A Rafa por compartir tu filosofía y hacerme ver la vida con otros ángulos. A Luis por sacarme las dosis de alegría hasta en los momentos más difíciles. A Elena por todos los buenos momentos compartidos y por los ánimos y apoyo que me has dado. A Shelly aunque hayamos coincidido poco tiempo pero suficiente para darme cuenta lo cariñosa y encantadora que eres. A Pili y Fernando por estar siempre presentes a través de Marisa. A Marina, Juan, Alejandra y David por hacerme desconectar del mundo de los adultos y pasarlo como un niño jugando con vosotros.

Gracias a mi familia de Andorra. Gracias por confiar en mí y apoyarme a lo largo de esta larga e intensa etapa de mi vida académica. A Saida por estar cuando te necesitó, nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que has hecho por mí. A Musta por toda la ayuda, por tus consejos y por el apoyo demostrado en todo momento. A Souhaila, Salma, Samia, Karim, Souad, Wiham por estar allí, por vuestros ánimos, apoyo y por ser unos sobrinos geniales. En especial a Souhaila por tu situación. A Ali por tu apoyo y ánimos. A Hassana y Mohamed por toda la ayuda y soporte que me habéis dado estos años. A Said y Abdou por vuestro apoyo y

8 AGRADECIMIENTOS

ayuda de manera constante estos últimos años, me ha servido enormemente para levantarme de nuevo y afrontar esta última etapa, una de las más difíciles y duras de mi vida. A Omar y Rabeha por haber confiado tanto en mí desde el primer momento, por toda vuestra ayuda y ánimos. A mi primo Jamil por haberme animado a estudiar. A mi padre por enseñarme a como hay que tomarse la vida y por todo lo que me has aportado.

Gracias a mis primos de Asturias. Especialmente a mi primo Rachid, una persona fuerte, valiente y un gran luchador. Me has enseñado a no rendirme en ninguna circunstancia y luchar cada día. A mi primo Hassan por recordarte siempre de mí. Por todos los buenos momentos, ánimos y por la ayuda que siempre me ofreces.

Gracias a mi familia de Marruecos, mis tíos y primos. Por los buenos momentos y por vuestro apoyo.

Gracias a todos los que me he podido dejar en el tintero pero que me han ayudado en todo este tiempo.