



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

DESCIFRANDO LAS ACTIVIDADES AUTOFÁGICAS
NO CANÓNICAS DE ATG16L1 Y SU RELACIÓN CON
LA PROTEINA TRANSMEMBRANA TMEM59

Tesis doctoral

ÁLVARO FERNÁNDEZ CABRERA
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER
CSIC-UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
JULIO 2023

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 “Descifrando las actividades autofágicas no canónicas de ATG16L1 y su relación con la proteína transmembrana TMEM59” presentada por Don Álvaro Fernández Cabrera, 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 junio de 2023



Fdo.: Dr. Felipe X. Pimentel Muiños

La financiación para la realización de este trabajo de tesis doctoral procede de proyectos concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación (Ref. SAF2017-88390-R) y (Ref. PID2020-114699RB-100). El doctorando Don Álvaro Fernández Cabrera ha recibido financiación de la Universidad de Salamanca por el programa de ayudas para financiar treinta y cuatro contratos predoctorales de la Universidad de Salamanca, cofinanciadas por el Banco Santander. La financiación, en régimen de concurrencia competitiva ocurre mediante la modalidad de contrato predoctoral, según establece el artículo 21 de la Ley 14/2011, de 1 de junio, de la Ciencia, la Tecnología y la Innovación, para la realización de la tesis doctoral en un Departamento, Centro o Instituto de la Universidad de Salamanca. Al doctorando se le concedió una extensión del contrato de cinco meses de duración (diciembre 2022-mayo 2023).

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	17
RESUMEN.....	37
INTRODUCCIÓN.....	41
1. ¿QUÉ ES LA AUTOFAGIA?.....	43
1.1. TIPOS DE AUTOFAGIA.....	44
2. MAQUINARIA DE GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA.....	46
2.1. INDUCTORES.....	47
2.1.1. EL COMPLEJO mTOR Y VIAS DEPENDIENTES.....	48
2.1.2. INDUCTORES mTOR INDEPENDIENTES.....	50
2.2. GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA.....	50
2.2.1. INICIACIÓN.....	51
2.2.2. NUCLEACIÓN.....	53
2.2.3. ELONGACIÓN DEL FAGÓFORO.....	54
2.2.4. MADURACIÓN: CIERRE Y TRANSPORTE DEL AUTOFAGOSOMA.....	57
2.2.5. FUSIÓN Y DEGRADACIÓN.....	58
3. AUTOFAGIA SELECTIVA.....	61
3.1. MITOFAGIA.....	63
3.2. PEXOFAGIA.....	64
3.3. AGREFAGIA.....	64
3.4. RETICULOFAGIA.....	65
3.5. FAGOCITOSIS ASOCIADA A LC3 (LAP).....	66
3.6. LISOFAGIA.....	67
3.7. XENOFAGIA.....	68
3.8. OTROS TIPOS.....	69
4. AUTOFAGIA NO CANONICA.....	70
5. FISIOPATOLOGÍA ASOCIADA A AUTOFAGIA.....	77
5.1. CÁNCER.....	77
5.2. INMUNIDAD INNATA Y AUTOINMUNIDAD.....	78
5.3. SÍNDROMES METABOLICOS.....	79
5.4. NEURODEGENERACIÓN.....	80
5.5. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.....	81
6. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO.....	82
MATERIALES Y MÉTODOS.....	87
1. CULTIVOS CELULARES.....	89
1.1. LINEAS CELULARES.....	89
1.2. CONDICIONES DE CULTIVO.....	90

1.3.	MANTENIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO	90
1.4.	SIEMBRA DE CÉLULAS EN PLACA	91
1.5.	CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS	91
2.	LINEAS CELULARES TRANSDUCIDAS	92
2.1.	TRANSDUCCIÓN MEDIANTE RETROVIRUS	92
2.2.	TRANSDUCCIÓN MEDIANTE LENTIVIRUS	93
3.	PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	94
3.1.	SISTEMAS DE EXPRESIÓN	94
3.1.1.	SISTEMA PEAK8 Y PEAK12.....	94
3.1.2.	SISTEMA p12/MMP.....	97
3.1.3.	SISTEMA CRISPR/Cas9	98
3.1.4.	ETIQUETAS O TAGs UTILIZADAS	98
3.2.	AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCRs	99
3.2.1.	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	99
3.2.2.	CONDICIONES DE PCR	99
3.2.3.	PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO DE PCR.....	100
3.3.	MUTACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCRs MUTAGÉNICAS (MUTAGENESIS DIRIGIDA).....	101
3.3.1.	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS	101
3.3.2.	CONDICIONES DE PCR	102
3.3.3.	PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO	102
3.4.	DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN	103
3.5.	LIGACION DE FRAGMENTOS DE ADN	104
3.6.	TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES.....	105
3.7.	GENERACIÓN DE DNA PLASMIDICO	106
3.7.1.	MINIPREPARACIONES	106
3.7.1.	DIGESTION DIAGNÓSTICA	107
3.7.2.	SECUENCIACIÓN	107
3.7.3.	MIDIPREPARACIONES Y MAXIPREPARACIONES.....	108
4.	TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS.....	108
5.	LISIS CELULAR.....	109
5.1.	LISIS EN SB2X	111
5.2.	LISIS EN NP40.....	111
5.3.	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	111
6.	WESTERN BLOT	112
6.1.	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	112
6.2.	ELECTROFORESIS SDS-PAGE	112
6.3.	TRANSFERENCIA HÚMEDA	114
6.4.	BLOQUEO Y ANTICUERPOS	115
6.4.1.	BLOQUEO.....	115
6.4.2.	ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	115
6.4.3.	ANTICUERPOS SECUNDARIOS.....	116

6.5. REVELADO	116
7. CO-INMUNOPRECIPITACIONES (coIPs)	116
7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	116
7.2. PRE-LAVADO	117
7.3. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN Y LAVADOS	117
7.4. CO-INMUNOPRECIPITACIONES CON ANTICUERPO.....	118
8. INMUNOFLUORESCENCIAS	119
8.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS.....	119
8.2. INMUNOFLUORESCENCIA	120
8.3. VISUALIZACIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	120
9. INFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO POR S. PYOGENES.....	121
9.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS	122
9.2. CRECIMIENTO BACTERIANO	122
9.3. INFECCIÓN CELULAR	123
9.4. MEDICIÓN DE LA INFECCIÓN BACTERIANA POR CITOMETRÍA DE FLUJO	
125	
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	126
OBJETIVOS	127
RESULTADOS	131
CAPITULO 1. ANÁLISIS DE POTENCIALES INTERACTORES DEL	
DOMINIO WD DE ATG16L1	133
1. SELECCIÓN DE MOLÉCULAS CANDIDATAS: LOS RECEPTORES DE	
INTERLEUQUINAS	135
2. VALIDACIÓN DEL MOTIVO DE INTERACCIÓN AL DOMINIO WD DE	
LOS RECEPTORES	140
2.1. ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DE UNIÓN AL DOMINIO WD	140
2.2. GENERACIÓN DE MUTANTES PUNTUALES EN EL MOTIVO DE	
INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES CANDIDATOS	145
2.3. EL MOTIVO ENCONTRADO EN EL IL-2RG Y EL IL-10RB MEDIA LA	
INTERACCIÓN CON EL DOMINIO WDD.	146
2.4. ANALISIS DE EXPRESIÓN DE LOS MUTANTES PUNTUALES PARA EL	
RESTO DE INTERACTORES ESPECÍFICOS.....	148
2.5. EL MOTIVO ENCONTRADO EN LOS RECEPTORES ANALIZADOS NO	
MEDIA LA UNIÓN CON EL DOMINIO WD.....	149
3. ANÁLISIS DE RECEPTORES CUYOS MOTIVOS DE INTERACCIÓN AL	
WDD RESULTARON NEGATIVOS	151
3.1. GENERACIÓN DE DELECCIONES SERIADAS C-TERMINALES	151
3.2. EL ESTUDIO DE ESTAS DELECCIONES MUESTRA OTRO POSIBLE	
DOMINIO DE UNIÓN AL WDD	153

CAPITULO 2. TMEM59 Y SU PAPEL EN AUTOFAGIA NO CANÓNICA.....	159
1. TMEM59 Y SU RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA LISOSOMAL	161
1.1. GENERACIÓN DE MEFs DEFICIENTES EN TMEM59 RECUPERADOS CON TMEM59-mRFP	161
1.2. TMEM59 PUEDE CONTROLAR LA CANTIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS LISOSOMAS	162
1.3. TMEM59 ES UNA PROTEÍNA LISOSOMAL	164
2. ANÁLISIS DE TMEM59 DENTRO DE LA RUTA NO CANÓNICA	166
2.1. LOS AMINOÁCIDOS F467 Y K490 NO SON NECESARIOS	166
PARA LA INTERACCIÓN ENTRE ATG16L1-TMEM59.....	166
2.2. LOS RESIDUOS F467 Y K490 MEDIAN LA LIPIDACIÓN DE LC3 PRODUCIDA POR TMEM59.....	170
2.3. TMEM59 NO ES NECESARIO EN LA LIPIDACIÓN DE LC3	173
POR PARTE DE LA AUTOFAGIA NO CANÓNICA	173
2.4. SopF, UNA PROTEÍNA BACTERIANA COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR TMEM59.....	174
2.5. ESTUDIOS DE RIBOSILACIÓN DE SopF	176
2.6. IMPACTO DE SopF EN LA INTERACCIÓN ATG16L1-TMEM59	178
3. ASOCIACIÓN DE TMEM59 CON EL FRAGMENTO TRANSMEMBRANA (V₀) DE LA v-ATPasa	179
3.1. INTERACCIÓN DE TMEM59 CON LA SUBUNIDAD V _{0c} DE LA v-ATPasa	179
3.2. LA INTERACCIÓN TMEM59/ATP6-V _{0c} ES INSENSIBLE A SopF	180
3.3. LA REGIÓN INTRACELULAR DE TMEM59 NO MEDIA LA ASOCIACIÓN CON LA V _{0c}	182
3.4. QUIMERAS DE TMEM59 SUGIEREN QUE LA REGIÓN TRANSMEMBRANA PODRÍA ESTAR INVOLUCRADA EN LA UNIÓN DE TMEM59 Y V _{0c}	184
3.5. UN POSIBLE COMPLEJO TRIPLE ATG16L1/TMEM59/ATP6-V _{0c}	187
4. ASOCIACIÓN DE TMEM59 CON EL FRAGMENTO CITOSÓLICO (V₁) DE LA v-ATPasa	189
4.1. LA UNIÓN TMEM59-V _{1A} NO PARECE NECESITAR EL FRAGMENTO TRANSMEMBRANA (V ₀)	189
4.2. EL MOTIVO DE UNIÓN A ATG16L1 NO MEDIA LA INTERACCIÓN CON LA SUBUNIDAD V _{1A}	190
4.3. EL FRAGMENTO FM (282-323) ES SUFICIENTE PARA QUE SE PRODUZCA LA UNIÓN ENTRE TMEM59 Y ATP6-V _{1A}	192
4.4. EL DOMINIO DE UNIÓN A LA SUBUNIDAD V _{1A} ESTÁ INCLUIDO ENTRE LOS RESIDUOS R290 Y I323 DE TMEM59.....	194
CAPITULO 3. TMEM59 Y SU PAPEL EN XENOFAGIA	197
1. INTRODUCCIÓN DE TMEM59 EN XENOFAGIA	199

2. TMEM59 EN RESPUESTA A INFECCIÓN POR <i>STREPTOCOCCUS PYOGENES</i>	199
2.1. INDUCCIÓN DE TMEM59 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>S. PYOGENES</i>	199
2.2. TMEM59 CO-LOCALIZA CON <i>S. PYOGENES</i> Y LAMP1	201
2.3. GENERACIÓN DE MEFs PARA ESTUDIOS DE INFECCIÓN MEDIANTE CITOMETRIA.....	205
2.4. LA AUSENCIA DE TMEM59 FAVORECE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR <i>S. PYOGENES</i>	206
2.5. GENERACIÓN DE MEFs DEFICIENTES EN ATG16L1.....	208
2.6. ATG16L1 NO PARTICIPA EN LA FUNCIÓN XENOFÁGICA DE TMEM59	210
DISCUSIÓN	213
CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE POTENCIALES INTERACTORES CON EL DOMINIO WDD DE ATG16L1.....	215
CAPÍTULO 2. TMEM59 Y SU RELACIÓN CON AUTOFAGIA NO CANÓNICA	218
CAPÍTULO 3. TMEM59 Y SU PAPEL EN XENOFAGIA	223
CONCLUSIONES.....	225
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	229
ANEXOS	259
ANEXO I – OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR.....	261
ANEXO II – ANTICUERPOS PRIMARIOS	268
ANEXO III – ANTICUERPOS SECUNDARIOS	269

FIGURAS

Figura 1. Esquema general con las diferentes etapas de la macroautofagia, comúnmente denominada como autofagia	51
Figura 2. Esquema de la formación del autofagosoma antes de transportarse y fusionarse con los lisosomas	60
Figura 3. Tipos de autofagia selectiva dependiendo del cargo a degradar.....	62
Figura 4. Estructura del dominio WD de ATG16L1	73
Figura 5. V-ATPasa.....	76
Figura 6. Secuencias de aminoácidos de TMEM59	83

Figura 7. Tipos de receptores de interleuquinas encontrados	139
Figura 8. Colección de receptores de interleuquinas cuya unión a ATG16L1 se produce a través tanto del dominio WD como del dominio N-terminal	141
Figura 9. Colección de receptores de interleuquinas con unión WDD-dependiente a ATG16L1	142
Figura 10. Inmunoprecipitación reversa del IL-2RG WDD-dependiente	143
Figura 11. Los receptores IL-2RG e IL-18R1 poseen una unión defectiva al ATG16L1- Δ WDD	144
Figura 12. Las mutaciones puntuales generadas en los receptores IL-2RG (a) y IL-10RB (b) inhiben la interacción de estos con ATG16L1 FL.....	147
Figura 13. Análisis de los niveles de expresión de los diferentes mutantes puntuales generados	148
Figura 14. Las mutaciones puntuales generadas no inhiben la interacción con el dominio WDD de ATG16L1	150
Figura 15. Esquema ilustrativo de las diferentes deleciones que generamos en los tres receptores	153
Figura 16. Las deleciones de la región intracelular del IL-18RAP localizan la posible región interactora de WDD entre las deleciones Δ F514 y Δ K445	154
Figura 17. Las deleciones de la región intracelular del IL-18R1 y del IL-33R (IL-1RL1) localizan la posible región interactora de WDD entre las deleciones Δ L443 y la Δ P401 en el caso del IL-18R1 y entre las deleciones Δ L448 y la Δ K412 en el caso del IL-33R (IL-1RL1)	155
Figura 18. Alineamiento de la secuencia de las diferentes deleciones responsables de la interacción con el dominio WD	157
Figura 19. Logo de secuencias de la región delecionada donde se encuentra el posible motivo interactivo de ATG16L1	157
Figura 20. La sobreexpresión estable se produce de manera diferencial entre la versión WT y la versión 4M de TMEM59-mRFP	162
Figura 21. Los distintos niveles de TMEM59 no alteran la localización ni la morfología de las estructuras LAMP1 positivas.....	163
Figura 22. TMEM59 co-localiza de manera fisiológica con LAMP1 en el lisosoma	165
Figura 23. Los niveles de expresión de los mutantes generados son equiparables entre sí.....	167

Figura 24. Las mutaciones F467A, K490A y la doble mutación no alteran la asociación entre TMEM59 y el dominio WD de ATG16L1	168
Figura 25. Las mutaciones F467A, K490A y la doble mutación no alteran la asociación entre TMEM59 y ATG16L1.....	169
Figura 26. Los mutantes generados en las HCTs se expresan de manera equiparable	170
Figura 27. Los mutantes F467A, K490A y el doble mutante no son capaces de lipidar LC3-II ante la activación de la autofagia no canónica por monensina	171
Figura 28. La sobreexpresión de TMEM59 no consigue lipidar LC3-II en presencia de los mutantes F467A, K490A y el doble mutante	172
Figura 29. La ausencia de TMEM59 no impacta en la lipídación de LC3-II por monensina	173
Figura 30. Niveles de expresión de las proteínas ATP6-V _{0c} , ATP6-V _{1A} y GFP-SopF	175
Figura 31. Estudio de SopF inhibiendo la lipídación de LC3-II	175
Figura 32. La proteína bacteriana SopF no muestra ningún tipo de shift en los dos dominios del WD de ATG6L1	177
Figura 33. SopF no altera la interacción entre ATG16L1 y TMEM59.....	178
Figura 34. TMEM59 interacciona con la subunidad V _{0c} de la v-ATPasa.....	180
Figura 35. La interacción entre TMEM59 y la subunidad V _{0c} de la v-ATPasa no es sensible a SopF	181
Figura 36. Detalle de la subunidad V _{0c} de la v-ATPasa	182
Figura 37. La región intracelular de TMEM59 no media la interacción con la V _{0c}	183
Figura 38. Las quimeras de TMEM59 sugieren la idea de que el dominio transmembrana podría ser el responsable de la asociación con la V _{0c}	185
Figura 39. Los ensayos de triple co-inmunoprecipitación no descartan la posibilidad de la existencia de un complejo triple entre TMEM59/ATG16L1/ATP6-V _{1A}	187
Figura 40. TMEM59 y V _{1A} interaccionan de manera monensina independiente	189
Figura 41. TMEM59 interacciona con la subunidad V _{1A} a partir del aminoácido 282.....	191
Figura 42. El fragmento FM (282-323) retiene toda la capacidad de unión a la V _{1A} de TMEM59-WT	193
Figura 43. La región interactora de TMEM59 con la V _{1A} comprende desde el R290 hasta la I323	194
Figura 44. El tag GST no da fondo y la construcción FM sigue manteniendo toda la capacidad de unión a la V _{1A} del TMEM59.....	196

Figura 45. La infección por <i>S. pyogenes</i> induce la expresión de TMEM59 a partir de las 8 horas post-infección.....	200
Figura 46. Ensayos de infección en MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP (-8) revelan una fuerte co-localización de TMEM59 con las estructuras LAMP1 positivas que rodean a la bacteria.	202
Figura 47. Ensayos de infección en MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP (+8) revelan una fuerte co-localización de TMEM59 con las estructuras LAMP1 positivas que rodean a la bacteria	203
Figura 48. Diferentes tipos de estructuras formadas por LAMP1 y TMEM59 con <i>S. pyogenes</i>	205
Figura 49. Los niveles de expresión de los MEFs recuperados con la versión WT y la versión 4M de TMEM59-HA son similares	206
Figura 50. Los MEFs deficientes en TMEM59 controlan peor la infección producida por <i>S. pyogenes</i>	207
Figura 51. Generación MEFs WT y TMEM59 KO de la estirpe +8 deficientes en ATG16L1	209
Figura 52. Los MEFs deficientes en TMEM59 y ATG16L1 -/- (dobles "knock-out") se comportan igual que los MEFs deficientes solo en TMEM59	211
Figura 53. Esquema de los diferentes receptores de interleuquinas estudiados y su relación con ATG16L1	218
Figura 54. Esquema de la posible doble función de TMEM59.....	222

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las diferentes proteínas relacionadas con autofagia (ATGs)	47
Tabla 2. Lista de receptores de interleuquina obtenidos en los arrays	137
Tabla 3. Motivos de los receptores de interleuquina sujetos a las mutaciones puntuales.....	146
Tabla 4. Secuencia conservada de las deleciones en las diferentes proteínas poseedoras de motivos TIR.....	157

ABREVIATURAS

NOMBRE	SIGNIFICADO
μg	Microgramos.
μl	Microlitros.
μM	Micromolar.
AMBRA-1	Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy, molécula activadora en la autofagia regulada por Beclin1.
AMP	Adenosine monophosphate, adenosín monofosfato.
AMPK	AMP-activated protein kinase, proteína quinasa activada por AMP.
APP	Amyloid precursor protein, proteína precursora amiloide.
APS	Ammonium persulfate, persulfato amónico.
ATCC	American Type Culture Collection.
ATG X	Autophagy-related gene X, proteína X relacionada con autofagia.
ATP	Adenosine triphosphate, adenosín trifosfato.

NOMBRE	SIGNIFICADO
BCL-xL	B-cell lymphoma-extra large, proteína de linfoma de células B extra-grande.
BNIP3	BCL-2 interacting protein 3, proteína 3 de interacción a BCL-2
BNIP3L	BCL-2 interacting protein 3 like, proteína similar 3 de interacción a BCL-2
BSA	Bovine serum albumin, seroalbúmina bovina.
cAMP	Cyclic AMP, AMP cíclico
Cas9	CRISPR associated protein 9, proteína 9 asociada a CRISPR.
CASM	Conjugation of LC3 at single membranes, conjugación de LC3 en membranas sencillas.
CCT2	Chaperonin containing TCP1 subunit 2, chaperonina contenedora de la subunidad 2 de TCP1.
CD	Crohn's disease, enfermedad de Crohn.
CD16/CD7	Cluster of differentiation 16 y 7, clúster de diferenciación 16 y 7.
CIP	Calf-intestinal alkaline phosphatase, fosfatasa intestinal alcalina de ternero.

NOMBRE	SIGNIFICADO
CMA	Chaperone-mediated autophagy, autofagia mediada por chaperonas.
coIP	Co-immunoprecipitation, co-inmunoprecipitación.
CRD	Carbohydrate recognition domain, dominio de reconocimiento de carbohidratos
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, repeticiones cortas y palindrómicas agrupadas regularmente espaciadas.
CrmA	Cytokine response modifier A, modificador A de respuesta a citoquinas.
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2 fenilindol.
DEPTOR	DEP domain containing mTOR interacting protein, proteína interactora de mTOR contenedora de dominio DEP.
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's médium, medio de Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido.
dNTP	Deoxynucleotide triphosphates, desoxirribonucleótido trifosfato.
ECL	Enhanced chemiluminescence, quimioluminiscencia aumentada.

NOMBRE	SIGNIFICADO
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético.
EF1- α	Human elongation factor-1 α , factor 1 α de elongación humano.
ER	Endoplasmatic reticulum, retículo endoplasmático.
ERAD	Endoplasmatic reticulum associated degradation, degradación asociada al retículo endoplasmático.
ERES	Endoplasmatic reticulum specialized regions, regions especializadas del retículo endoplasmático.
ERGIC	Endoplasmatic reticulum golgi intermediate compartment, compartimento intermedio entre el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático.
ESCRTs	Endosomal sorting complexes required for transport, complejos de sorting endosomal requeridos para el transporte.
EXT	Extracelullar, extracelular.
FAM134B	RETREG1, Reticulophagy regulator 1.
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.

NOMBRE	SIGNIFICADO
FL	Full length, longitud completa.
FoxO3	Forkhead box protein O3, proteína O3 forkhead box.
FUNDC14	FUN14 domain-containing protein 1, proteína 1 contenedora de motivo FUN14.
FZD	Receptor Frizzled de la via Wnt.
GβL	G protein β-subunit-like, proteína similar a la subunidad β de la proteína G.
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein, proteína asociada al receptor del ácido gamma-aminobutírico.
GFP	Green fluorescent protein, proteína verde fluorescente.
GSH	Glutathione, glutatión.
GSK-3β	Glycogen synthase kinase 3β, quinasa glucógeno sintasa 3β
GST	Glutathione S transferase, glutatión S-transferasa.
HA	Influenza virus hemagglutinin 1, hemaglutinina 1 de Influenzavirus.

NOMBRE	SIGNIFICADO
HCT116	Human colon cancer cell 116, células de carcinoma de colon humano 116.
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).
HeLa	Henrietta Lacks cells, células de Henrietta Lacks.
HOPS	Homotypic fusion and protein sorting, proteína de fusión homotípica y clasificación de proteínas.
HRP	Horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano.
HSC70	Heat-shock protein of 70 kDa, proteína de shock térmico de 70 kDa.
IBD	Inflammatory bowel disease, enfermedad inflamatoria intestinal.
IgG	Immunoglobulin G, inmunoglobulina G
IL-Xs	Interleukin-X, interleuquina-X.
IL-XRs	Interleukin-X receptor, receptor de interleuquina-X.
IMM	Inner mitochondrial membrane, membrana mitocondrial interna.

NOMBRE	SIGNIFICADO
IMPasa	Inositol-1-monophosphatase, monofosfatasa de inositol 1
IP	Immunoprecipitation, inmunoprecipitación.
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphate, inositol-1,4,5-trifosfato.
IRES	Internal ribosome entry site, sitio interno de entrada al ribosoma.
Jak	Janus kinase, Janus quinasa.
kB	Kilobase, kilobase.
KCl	Potassium chloride, cloruro de potasio
kDa	Kilodalton, kilodalton.
KH₂PO₄	Monopotassium phosphate, fosfato monopotásico
KO	Knock-out, knock-out.
LAMNB1	Lamin B1, lamina B1

NOMBRE	SIGNIFICADO
LAMP1A	Lysosomal-associated membrane protein 1, proteína 1 asociada a la membrana lisosomal.
LAMP2A	Lysosomal associated membrane protein 2, proteína 2A asociada a la membrana lisosomal.
LAP	LC3 associated phagocytosis, fagocitosis asociada a LC3.
LB	Luria Bertani.
LC3	Microtubule-associated protein light chain 3, proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos.
LIR	LC3 interacting domain, dominio de interacción a LC3
LMP	Lysosomal membrane permeabilization, permeabilización de la membrana lisosomal
LRP6	LDL receptor related protein 6, proteína 6 relacionada con receptor de lipoproteínas de baja densidad
LTR	Long terminal repeat, repeticiones terminales largas.
MEF	Mouse embryonic fibroblasts, fibroblastos embrionarios de ratón.
MFN1/2	Mitofusins 1/2, mitofusinas 1 y 2.

NOMBRE	SIGNIFICADO
ml	Mililitre, mililitro.
mM	Milimolar, milimolar.
MOI	Multiplicity of infection, multiplicidad de infección.
mRFP	Monomeric red fluorescent protein, proteína roja fluorescente monomérica.
MTOC	Microtubule organizing centre, centro organizador de microtúbulos.
mTOR	Mammalian target of rapamycin complex 1/2, diana de rapamicina en mamíferos complejo 1/2.
MVB	Multi vesicular body, cuerpo multivesicular.
Myd88	Myeloid differentiation primary response protein 88, proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide
NaCl	Sodium chloride, cloruro sódico.
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease, enfermedad de hígado graso no alcohólico.
NBR1	Next to BRCA1 gene 1 protein, proteína 1 junto al gen BRCA1.

NOMBRE	SIGNIFICADO
NBRF2	ATG38
NDP52	Nuclear dot protein 52, proteína de puntos nucleares 52.
NLRX1	NOD-like receptor X1, receptor X1 similar a NOD.
nM	Nanomolar, nanomolar.
NOD1/2	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1/2, proteína 1/2 que contiene el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos.
NUFIP1	Nuclear FMR1 interacting protein 1, proteína 1 de interacción a FMR1 nuclear.
OD ₆₀₀	Optical density 600 nm, densidad óptica a 600 nm.
OMM	Outer mitochondrial membrane, membrana mitocondrial externa.
OPTN	Optineurin, optineurina.
PAS	Phagophore assembly site, sitio de ensamblaje del fagóforo.
PBS	Phosphate buffered saline, tampón fosfato salino.

NOMBRE	SIGNIFICADO
PCR	Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa.
PE	Phosphatidylethanolamine, fosfatidiletanolamina.
PEX X	Peroxin X, peroxina X.
PFA	Paraformaldehyde, paraformaldehido
PHB2	Prohibitin 2, prohibitina 2.
PI	Phosphatidylinositol, fosfatidilinositol.
PI ₃ K	Phosphatidylinositol 3-kinase, fosfoinositol-3-quinasa o fosfatidilinositol 3-quinasa.
PI ₃ P	Phosphatidylinositol 3-phosphate, fosfatidilinositol-3-fosfato.
PIC	Protease inhibitor cocktail, cocktail de inhibidores de proteasas.
PINK1	PTEN-induced kinase 1, quinasa inducida por PTEN 1.
PLIN	Perilipin, perilipina.

NOMBRE	SIGNIFICADO
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride, fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 kDa, substrato de Akt de 40 kDa rico en prolina.
PRKN	Parkin, parkina.
PS	Phosphatidilserine, fosfatidilserina.
PURO	Puromycin, puromicina.
PVDF	Polyvinylidene fluoride, polifluoruro de vinilideno.
Rab X	Ras-associated binding protein X, proteína de unión X asociada a Ras.
RAPTOR	Regulatory associated protein of mTOR, proteína reguladora asociada a mTOR.
RCF	Relative centrifuge force, fuerza centrífuga relativa.
RICTOR	Rapamycin-sensitive companion of mTOR, proteína de mTOR sensible a la rapamicina.
ROS	Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno.

NOMBRE	SIGNIFICADO
RPM	Revolutions per minute, revoluciones por minuto.
RSB	Reducing sample buffer, buffer reductor para muestra.
RTN3L	Reticulon-3 like protein, proteína similar a reticulón 3.
RUBCN	Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein, proteína de interacción con el dominio ejecutor de Beclin-1 con dominios ricos en cisteína.
SARM	Sterile alpha and armadillo repeat protein, proteína contenedora del motivo estéril y motivo armadillo.
SB	Sample buffer, buffer para muestra.
SDS	Sodium dodecyl sulfate, dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
SEC62	Translocation protein SEC62, proteína translocadora SEC62.
SIN-1	SAPK-interacting protein 1, proteína 1 interactora de la quinasa SAP.
SLE	Systemic lupus erithematosus, lupus eritematoso sistémico.

NOMBRE	SIGNIFICADO
SMPD1	sphingomyelin phosphodiesterase 1, esfingomielina fosfodiesterasa 1.
SNARE	Soluble NSF attachment protein receptor, receptor de proteínas de unión de NSF soluble.
SQSTM-1	Sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62, proteína de unión a ubiquitina p62.
Stbd1	Starch binding domain 1, dominio 1 de unión a almidón.
STX17	syntaxine 17, syntaxina 17.
SV40	Simian vacuolating virus 40, virus 40 vacuolado del simio.
TAE	Tris acetate-EDTA buffer, buffer tris acetato-EDTA.
TAX1BP1	Tax1 binding protein 1, proteína de unión a Tax1.
TBK1	TANK1 binding kinase 1, quinasa de unión a TANK1.
TBS	Tris-buffered saline, solución salina tamponada con tris.
TBS-T	Tween tris-buffered saline, solución salina tamponada con tris y Tween.

NOMBRE	SIGNIFICADO
TE	Buffer tris-EDTA, tampón tris-EDTA.
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina.
TEX264	Testis expressed 264, ER-phagy receptor, receptor de reticulofagia 264 expresado en testículo.
TFEB	Transcription factor EB, factor de transcripción EB.
THB	Todd-Hewitt Broth, caldo Todd-Hewitt.
TIMM23	Translocase of inner mitochondrial membrane 23, translocase 23 de la membrana mitocondrial interna.
TIR	Toll-interleukin-1 receptor domain, dominio homólogo de receptor de la interleuquina 1 y receptores Toll.
TIRAP	TIR adaptor protein, proteína adaptadora contenedora de dominio TIR
TL	Total lysate, lisado total.
TLR	Toll-like receptor X, receptor de tipo Toll X.
TM	Transmembrane, transmembrana.

NOMBRE	SIGNIFICADO
TMEM59	Transmembrane protein 59, proteína transmembrana 59.
TOMM	Translocase of outer mitochondrial membrane, translocasa de la membrana mitocondrial externa.
TRAM	TRIF related adaptor protein, proteína adaptadora relacionada con TRIF.
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta, proteína adaptadora contenedora de dominio TIR inductora de interferón β .
TRIM16	Tripartite motif 16, motivo tripartito 16.
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex 1/2, complejos 1/2 de esclerosis tuberosa.
UC	Ulcerative colitis, colitis ulcerosa.
ULK1/2	Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2, quinasa 1/2 activadora de la autofagia similar a unc-51.
UPR	Unfolded protein response, respuesta a proteínas mal plegadas.
UPS	Ubiquitin/proteasome system, sistema ubiquitina/proteasoma.
VAIL	v-ATPase/ATG16L1-induced lipidation, lipidación de LC3 mediada por la unión de la v-ATPasa y ATG16L1.

NOMBRE	SIGNIFICADO
VAM8	Vesicle-associated membrane protein 8, proteína 8 de membrana asociada a vesículas.
VDAC	Voltage-dependent anion channel, canal de aniones dependiente de voltaje.
VPSX	Vacuolar protein sorting-associated protein X, proteína X asociada a la clasificación de proteínas vacuolares.
WDD	WD domain, dominio WD.
WIP1/2	WD-repeat protein interacting with phosphoinositides, proteína con repeticiones WD que interacciona con fosfoinositol.

RESUMEN

La autofagia es un conjunto de procesos catabólicos encargados de la degradación y reciclaje de material celular, como orgánulos dañados, agregados proteicos o entidades provenientes del exterior celular como microorganismos. Existen tres tipos principales de autofagia según la modalidad por la que el cargo a degradar es secuestrado: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA de sus siglas en inglés *Chaperone Mediated Autophagy*). En esta tesis doctoral nos centraremos en el proceso de macroautofagia (entendido como autofagia en este estudio). La autofagia puede ser no específica (lo que en inglés se denomina "bulk autophagy") o específica (autofagia selectiva). El término autofagia selectiva implica el reclutamiento de maquinaria específica del cargo a degradar. Así los procesos de autofagia selectiva son: mitofagia, pexofagia, agrefagia, lipofagia, nucleofagia, lisofagia, reticulofagia o xenofagia. La desregulación de los distintos procesos autofágicos conduce a la aparición de enfermedades neurodegenerativas, cáncer o enfermedad inflamatoria intestinal entre otras.

En el contexto de la enfermedad inflamatoria intestinal, parece ser que la proteína autofágica ATG16L1 podría jugar un papel fundamental. En concreto, una región que se encuentra en el dominio C-terminal de ATG16L1, presente solo en eucariotas: el dominio WD. Este nuevo dominio se ha visto involucrado en funciones autofágicas no convencionales (lo que denominaremos a partir de ahora como autofagia no canónica), un tipo de autofagia cuya finalidad no es meramente degradativa y que parece tener un papel particularmente relevante en la homeostasis intestinal y en la defensa contra la infección bacteriana.

Estudios previos en el laboratorio mostraron una interacción entre el dominio WD de ATG16L1 y la proteína transmembrana TMEM59, a través de la cual TMEM59 produce una respuesta autofágica del tipo "no canónico" en la que se marcan con LC3 los endosomas de membrana sencilla en los que se encuentra. El motivo aminoacídico interactivo de ATG16L1 presente en TMEM59

(denominado motivo pro-autofágico en esta tesis) se sometió previamente a un estudio de mutagénesis exhaustiva con el fin de mejorarlo para incrementar su utilidad en la identificación de otras proteínas que lo contengan y sean por tanto posibles interactores del dominio WD. Así fue identificada una colección de receptores de interleuquinas que fueron analizados en el *Capítulo 1* de *Resultados* de esta tesis doctoral.

Estudios previos indican que TMEM59 juega un papel en xenofagia en respuesta frente a infecciones por *S. aureus*. En el *Capítulo 2* y en el *Capítulo 3* de *Resultados* se estudió su función xenofágica frente a otra bacteria gram positiva: *Streptococcus pyogenes*, así como los mecanismos moleculares a través de los cuales induce su actividad autofágica y funciones xenofágicas.

INTRODUCCIÓN

1. ¿QUÉ ES LA AUTOFAGIA?

Se denomina autofagia a todo un conjunto de procesos catabólicos que tienen como finalidad el transporte de material citoplásmico como orgánulos dañados, proteínas mal plegadas, o incluso agentes exógenos como microorganismos¹ hacia el lisosoma para su consecuente degradación y reciclaje. Este reciclaje resulta esencial para mantener el balance entre síntesis y degradación celular, convirtiendo a la autofagia en un proceso clave para una correcta homeostasis, así como para el desarrollo y crecimiento celular². Fue Christian de Duve, bioquímico belga, el que en 1963 observó vesículas de doble membrana y membrana sencilla con material celular en diferentes estados de degradación², acuñando por primera vez en la historia el término autofagia, formado por la unión de los vocablos *auto-* y *-phagos* y que significa "auto-ingesta"³.

La autofagia es un proceso altamente conservado desde levaduras hasta mamíferos y si bien hay diversos estudios que hablan sobre procesos similares en bacterias y arqueas^{4,5,6}, actualmente no se ha demostrado que exista autofagia en procariontes. Incluso hay numerosas investigaciones en las que se describen genes homólogos ancestrales bacterianos de las actuales proteínas relacionadas con autofagia o ATGs^{7,8}. Todo esto sugiere que la aparición de la autofagia podría estar relacionada con la aparición de la vida eucariota, lo que la convertiría en una vía catabólica exclusiva de éstas².

Aunque la autofagia siempre se ha entendido como un proceso de degradación exclusivamente no selectivo, recientemente han aparecido estudios que observaron diferentes tiempos de degradación de proteínas y orgánulos celulares. Esto apuntaba a la idea de que existían procesos autofágicos más selectivos de lo que se postuló en un principio⁹. Actualmente se conocen varios modelos de autofagia selectiva clasificados según el cargo a degradar (véase *Introducción 3. Autofagia selectiva*). Para designar los

diferentes tipos de autofagia selectiva, normalmente se utiliza el cargo como prefijo (mito-, ER-, lipo-, nucleo-, pexo-, ribo-, agre-) seguido de fagia¹⁰. Por lo tanto, la clasificación se divide en: mitofagia¹¹ (degradación de mitocondrias), ribofagia¹² (degradación de ribosomas), reticulofagia¹³ (degradación del retículo endoplasmático), pexofagia¹⁴ (degradación de peroxisomas), lisofagia¹⁵ (degradación de lisosomas) e incluso agrefagia¹⁶ (degradación de agregados proteicos). En estos procesos selectivos, existe un marcaje diferencial de los cargos, lo que hace que las moléculas encargadas de la degradación sean específicas de cada tipo concreto.

Dada la importancia de este proceso en el mantenimiento del bienestar celular y tisular, la autofagia debe estar finamente regulada. Por ello, cualquier tipo de alteración o descompensación puede causar una gran variedad de problemas como cáncer, enfermedades neurodegenerativas, metabólicas, cardiovasculares o desórdenes inflamatorios (véase *Introducción 5. Fisiopatología asociada a autofagia*). También se ha visto que juega un papel importante en el envejecimiento, la protección frente a patógenos y la autoinmunidad^{17,10}.

1.1. TIPOS DE AUTOFAGIA

La clasificación más extendida de los tipos de autofagia se basa en la modalidad por la cual el potencial cargo de degradación entra en el compartimento lisosomal¹⁸. Así actualmente se conocen tres tipos de autofagia: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas y microautofagia.¹⁷

En primer lugar, la macroautofagia (entendida como autofagia en este estudio) puede ser un proceso selectivo (*selective autophagy*) o no selectivo (*bulk autophagy*). En ambos casos, el material a degradar viene empaquetado en una vesícula de doble membrana (autofagosoma). Más tarde, éste se fusiona o bien directamente con lisosomas, o bien con endosomas o endosomas tardíos

dando lugar a unas estructuras llamadas anfisomas^{1,19}. En cualquiera de los casos, la membrana externa de autofagosomas y anfisomas, se fusiona con la membrana lisosomal (autofagolisosoma), dejando la membrana interna con el material a degradar dentro. En el siguiente apartado se tratará con más detalle el proceso y la maquinaria necesaria para que se produzca este tipo de autofagia. El autofagolisosoma se forma por la fusión de un autofagosoma o un anfisoma con un lisosoma. Éste constituye el orgánulo final en el que ocurrirá la degradación gracias a su contenido en enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, fosfatasas, nucleasas y glicosidasas provenientes del lisosoma²⁰. Dado que el autofagosoma no tiene capacidad degradativa *per se*, necesita la fusión con el lisosoma para que este proporcione tanto las enzimas indispensables como el contexto ácido (ya que todas esas enzimas degradativas tienen su punto óptimo de actividad a pH 5) para que se produzca la degradación del cargo.

El segundo tipo es la autofagia mediada por chaperonas (*Chaperone-Mediated Autophagy* or *CMA*), un proceso selectivo que se encarga de la degradación específica de proteínas que contengan alguna versión del motivo aminoacídico KFERQ presente en alrededor de un 20-35% de las proteínas citosólicas²¹. Estas proteínas, una a una, son reconocidas por la proteína de shock térmico HSPA8/HSC70 que se encuentra constitutivamente activa²². La HSC70 reconoce proteínas desnaturalizadas (condición estrictamente necesaria para la CMA) y las dirige a la membrana lisosomal. Aquí, el complejo formado por la HSC70 y la proteína a degradar se une a monómeros de la proteína asociada a la membrana lisosomal (*LAMP2A*). Esta unión produce la multimerización de *LAMP2A* en un complejo de hasta 700 kDa, encargado de translocar la proteína cargo al lumen lisosomal para su degradación²³. La propia HSC70 es también la responsable del proceso de desensamblaje del multímero de *LAMP2A* para que ésta vuelva a su disposición monomérica y continuar secuestrando proteínas para su futura degradación²².

Por otro lado, la microautofagia se caracteriza por la entrada del material a degradar a través de diferentes tipos de invaginaciones de la membrana lisosomal (o de la membrana vacuolar en el caso de levaduras). Se ha visto que en levaduras, este proceso puede ser selectivo y reconocer pequeños orgánulos como mitocondrias (micromitofagia)²⁴, peroxisomas (micropexofagia)^{25,26}, lípidos (microlipofagia)²⁷ o porciones de núcleo (micronucleofagia)^{28,29}; o no selectivo y capturar pequeñas proteínas o moléculas a partir de invaginaciones tubulares³⁰ o moléculas más grandes a través de protrusiones en forma de dedo (*finger-like*)²⁴. Dado que la macroautofagia genera gran cantidad de membranas, se postula que la microautofagia podría compensar este superávit mediante la degradación de sus propias membranas, así como participando en el mantenimiento de éstas, manteniendo la ratio entre lípidos y proteínas, recogiendo estos últimos para llevarlos a degradación³¹. A pesar de que se hayan observado mitocondrias y peroxisomas dañados en lisosomas de células de mamífero, actualmente hay poca evidencia de que hayan entrado por microautofagia selectiva y no por macroautofagia convencional.

Independientemente del tipo de autofagia canónica que sea, existen dos características que todos los procesos autofágicos poseen que son i) englobar substratos citosólicos (endógenos o exógenos, siempre y cuando estén accesibles en el citoplasma para la maquinaria autofágica) y ii) el paso final es la degradación por parte del lisosoma.³

2. MAQUINARIA DE GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA

A pesar de todo el conocimiento generado sobre la autofagia durante años, no fue hasta 1993, cuando Yoshinori Ohsumi caracterizó 77 mutantes de unas 15 proteínas en levaduras (*apg* proteins) cuyos mutantes mostraban una

degradación defectiva de proteínas englobadas en vacuolas autofágicas inducidas por ayuno³². Además de Ohsumi, otros investigadores empezaron a descubrir y nombrar otras proteínas cuyas mutaciones también eran defectivas en autofagia^{33,34,35}, lo que obligó a renombrar todas ellas bajo un mismo nombre: ATGs o *autophagy related proteins*³⁶.

Actualmente, en mamíferos se conocen 41 ATGs diferentes, de los cuales solo 17 forman lo que se conoce como "*core ATG genes*". Estos 17 participan en el proceso de autofagia canónica y se subdividen en cinco grupos funcionales³⁷.

El complejo de ULK/ATG1	Atg1 (ULK1/2), Atg13 (ATG13), Atg17 (FIP200), Atg101 (ATG101).
Sistema de conjugación de ATG8	Atg3 (ATG3), Atg4 (ATG4-A/B/C/D), Atg7 (ATG7), Atg8 (LC3)
Complejo conjugador del complejo de ATG12	Atg5 (ATG5), ATG7, ATG10, Atg12 (ATG12), Atg16 (ATG16L1)
El complejo I de la PI ₃ quinasa de clase III	Vps15 (p150), Vps34 (VPS34), ATG6 Vps30 (Beclin-1), Atg14 (ATG14L), Atg38 (NBRF2).
ATG2 complex	Atg2 (ATG2), Atg9 (ATG9), Atg18 (WIPI1/2)

Tabla 1. Clasificación de las diferentes proteínas relacionadas con autofagia (ATGs). En la primera columna se muestran los nombres de las familias o complejos en los que se engloban cada una de las proteínas autofágicas (columna derecha). Los nombres de éstas son los usados en levaduras mientras que su homólogo en mamíferos se muestra entre paréntesis.

2.1. INDUCTORES

El inductor de autofagia más ampliamente estudiado es la deprivación de nutrientes, factores de crecimiento o energía. Además, el sensor más conocido ante este déficit energético es el complejo de mTOR, que constitutivamente reprime la ruta autofágica. En este apartado se explicará tanto la ruta de

inducción mTOR-dependiente como aquellas vías de activación de la autofagia que son mTOR-independientes¹.

2.1.1. EL COMPLEJO mTOR Y VIAS DEPENDIENTES

La vía de mTOR se activa a través de hormonas, factores de crecimiento, aminoácidos, niveles de energía y estrés celular entre otros. Esta ruta regula funciones muy importantes dentro de la célula como la autofagia, la proliferación celular o la generación de ribosomas³⁸. Se compone de dos complejos con diferentes subunidades. Por un lado, la serín/treonín quinasa mTOR, GβL (*G protein β-subunit-like*), DEPTOR (*DEP Domain Containing MTOR Interacting Protein*) y Tti1/Tel2 son comunes en ambos complejos. Por otro lado, mTORC1 contiene raptor (*regulatory associated protein of mTOR*) y PRAS40 (*proline-rich Akt substrate of 40 kDa*) y mTORC2 tiene rictor (*rapamycin-sensitive companion of mTOR*) y SIN1 (*SAPK-interacting protein 1*)³⁹.

Los mecanismos por los que mTORC1 inhibe la autofagia son varios y mientras que algunos están bien descritos, otros necesitan más revisión. Uno de los que está bastante establecido es la fosforilación de ULK1⁴⁰ (Atg1) y ATG13⁴¹ por parte de mTORC1. ATG13 necesita estar desfosforilada para iniciar el paso de nucleación (véase apartado 2.2.1 *Iniciación*), por lo que su fosforilación implica la inactivación del complejo de ATG1 y por tanto la autofagia. También se ha observado una inhibición mTOR-dependiente a nivel transcripcional, donde la serín/treonín quinasa es capaz de fosforilar la serina 211 de TFEB. Este factor de transcripción queda secuestrado en el citoplasma sin poder ser transportado al núcleo, donde iniciaría la transcripción de genes relacionados con la formación de lisosomas y demás estructuras autofágicas⁴². También mTORC2 es capaz de inhibir la autofagia a nivel transcripcional bloqueando la activación de FoxO3, un factor de transcripción que induce la transcripción de genes relacionados con autofagia como LC3B, Beclin1, ATG4B o ATG12

(aunque esto se ha visto en levaduras, en mamíferos solo se ha demostrado en células musculares)⁴³.

También existen otras vías que regulan indirectamente la autofagia de manera mTOR-dependiente. Por ejemplo, ante un estrés metabólico o falta de energía, los niveles intracelulares de ATP descienden, aumentando así los niveles de AMP. Este desbalance es reconocido por la proteína quinasa activada por 5'-AMP (AMPK) que se encarga de controlar el balance entre ATP:AMP. Cuando esto ocurre, la AMPK fosforila al complejo de proteínas de esclerosis tuberosa (*TSC1/2*), potentes inhibidoras de mTORC1. La primera fosforilación sirve de base para que otra quinasa, la glucógeno sintasa 3β (*GSK-3β*) las active a través de una segunda fosforilación, inhibiendo, por tanto, el complejo de mTORC1⁴⁴. También se ha visto que la activación de la AMPK puede inhibir directamente a mTOR a través de la fosforilación de Raptor⁴⁵.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS a partir de ahora, de sus siglas en inglés "*Reactive Oxygen Species*") son moléculas altamente reactivas que surgen a partir de la incompleta reducción del oxígeno⁴⁶. La lipidación de ATG8 (LC3) es esencial para iniciar la autofagia (véase el apartado 2.2.3 *Elongación*) y ATG4 es el encargado de delipidarlos para su posterior reciclaje⁴⁷. Hay estudios que demuestran que el estado oxidativo de ATG4 interviene en su actividad. Así, cuando ATG4 se encuentra en un estado oxidado (específicamente en la Cisteína 81) es inactivo y, por tanto, permite la lipidación de LC3 y la activación de la ruta autofágica. Por el contrario, ATG4 en un estado reducido se encontraría activo y, por tanto, capaz de delipidar LC3, inhibiendo así la autofagia⁴⁸.

Esto indica que, ante la aparición de ROS, ATG4 se encontraría en un estado inactivo y por tanto LC3 no se delipidaría, manteniendo la autofagia activa. Además, ROS también activa factores de transcripción como el previamente citado FoxO3 entre otros⁴⁹.

2.1.2. INDUCTORES mTOR INDEPENDIENTES

Se ha observado que el litio es un gran inductor de autofagia debido a la inhibición de enzimas encargadas del reciclaje del inositol libre como la inositol monofosfatasa (*IMPase*). Esta enzima se encarga de desfosforilar el inositol monofosfato en inositol libre (sustrato para formar el IP_3 (*inositol 1,4,5-triphosphate*)) con el consecuente descenso de los niveles de este y la activación de la autofagia⁵⁰. También se ha observado como todos los inhibidores del adenosín monofosfato cíclico (*c-AMP*) son inductores de autofagia ya que altos niveles de esta molécula, inhiben la vía autofágica⁵¹. Los niveles de Ca^{2+} intracelular también inhiben la autofagia por lo que antagonistas de canales de calcio como verapamilo o amiodarona inducen autofagia¹. Todos estos inductores basan su actividad en la reducción de los niveles de IP_3 para inducir autofagia.

Todas estas actividades son simplemente un breve resumen de la variedad y cantidad de estímulos diferentes que pueden iniciar el proceso autofágico. Se utilizará la deprivación de nutrientes como estímulo modelo para explicar el proceso completo de formación de autofagosomas.

2.2. GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA

La estructura principal de la ruta autofágica es el autofagosoma, una vesícula de doble membrana que encierra en su interior los cargos a degradar. Esta estructura no puede degradar *per se* y por tanto requiere su fusión en algún punto con los lisosomas, estructuras fundamentales en la degradación debido a su alto contenido en enzimas hidrolíticas (véase apartado 1.1. *Tipos de autofagia*). Todo esto es un proceso altamente dinámico, debido a las deformaciones que tiene que ir sufriendo la membrana para elongarse y secuestrar el cargo o para fusionarse con otros compartimentos como endosomas o lisosomas⁵². El proceso desde que el fagóforo comienza a

formarse hasta que el cargo viene degradado, se muestra en la siguiente figura a modo de esquema (Figura 1).

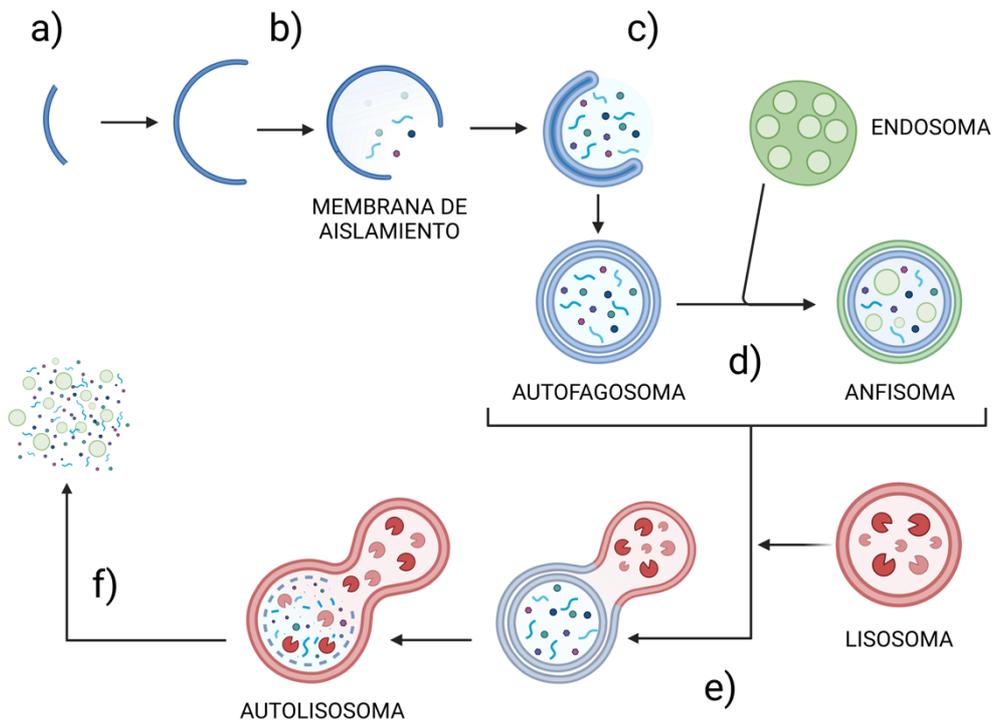


Figura 1. Esquema general con las diferentes etapas de la macroautofagia, comúnmente denominada como autofagia. a) Iniciación. b) Nucleación del fagóforo. c) Elongación del fagóforo. d) Maduración del fagosoma: cierre y transporte. e) Fusión con el lisosoma. f) Degradación del cargo contenido.

2.2.1. INICIACIÓN

La iniciación de la ruta comienza con el reclutamiento de las proteínas autofágicas a lo que en levaduras se vio que era una estructura perivacuolar con funciones no degradativas⁵³. Ésta se denominó estructura pre-autofagosomal, sitio de ensamblaje del fagóforo o PAS. A pesar de las homologías entre la autofagia en levaduras y mamíferos, actualmente no existen indicios que confirmen la existencia de esta estructura en mamíferos⁵⁴. Se postula que, en mamíferos, la iniciación de la autofagia podría tener origen en diferentes

compartimentos que funcionarían como donadores de membrana como la mitocondria⁵⁵, el compartimento intermedio entre el retículo y Golgi (*Endoplasmatic Reticulum Golgi Intermediate Compartment* or *ERGIC*)⁵⁶, el propio retículo endoplasmático⁵⁷, la membrana plasmática⁵⁸ o endosomas reciclados⁵⁹.

El complejo de Atg1 (levaduras) o ULK1 (mamíferos) (ULK1, ATG13, FIP200 (*FAK family kinase-interacting protein of 200kDa*) y ATG101) se encuentra potentemente inhibido por mTORC1 debido a la fosforilación de Atg1 y Atg13 (véase apartado 2.1.1. *El complejo mTOR y vías dependientes*). La desfosforilación de éstos es el evento que da paso al reclutamiento del resto de la maquinaria para empezar la formación del fagóforo. En el proceso de iniciación en levaduras se han visto implicadas Atg11 y Atg17, diversos estudios han demostrado que, ambas dos en su conjunto, son indispensables para la localización y movilización ordenada del resto de ATGs al PAS, funcionando como proteínas andamio (*scaffold proteins*)^{60,61,62}. Se hipotetiza que Atg13 necesita a Atg17 para acudir al PAS y posteriormente unir Atg1 de manera Atg13-dependiente y comenzar así la cascada de activación. Este proceso jerárquico de ensamblaje y desensamblaje de las diferentes ATGs parece estar regulado por el complejo de Atg1, sugiriendo la idea de que este complejo podría ser el responsable de la regulación del tamaño de los futuros autofagosomas⁶³, dejando a Atg11 y Atg17 como los protagonistas iniciales de la formación del fagóforo.

Se postula que la iniciación en mamíferos ocurriría de manera similar, funcionando el complejo ULK1 como activador del resto de la maquinaria encargada de la formación del fagóforo. La activación del complejo ULK-1 comprende una serie de autofosforilaciones, así como la activación de la PI₃K que dan lugar al siguiente paso de nucleación. Además, existe una acción cooperativa del complejo de ULK1 con el de ATG2-ATG18 (*WIPI1/2*) y ATG9,

funcionando este último como posible plataforma de ensamblaje de otros complejos. Estudios recientes postulan que compartimentos ATG9 positivos interactúan con regiones especializadas del retículo endoplasmático (*ERES*), pudiendo ser este último un donador de membrana esencial en el proceso de nucleación, elongación y maduración del fagóforo^{64,65}.

2.2.2. NUCLEACIÓN

Una vez generado el origen del fagóforo, se reclutan diferentes complejos que comenzarán el proceso de formación del fagóforo. Se ha observado que la formación de la membrana comienza en dominios del retículo ricos en fosfatidilinositol trifosfato (PI_3P), que comúnmente se denominan como omegasoma⁶⁶. Aquí entra en juego el complejo de la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI_3K) que está formado por Beclin-1, ATG14, VPS34 y p150. Este complejo se acumula en el fagóforo, y gracias a la fosforilación ULK1-dependiente a Beclin-1, ATG14 y a la propia VPS34⁶⁷, se activa esta última cuya actividad quinasa fosforila el fosfatidilinositol (PI) convirtiéndolo en fosfatidilinositol trifosfato (PI_3P)⁶⁸, molécula esencial en el proceso. También ULK1 es capaz de fosforilar AMBRA1 y liberar la VPS34 del citoesqueleto para que se transporte al retículo endoplasmático⁶⁹.

Tanto la activación del complejo de ULK1, como el complejo PI_3K tienen como función enriquecer el omegasoma con PI_3P y elongarlo⁷⁰.

Recientemente se ha descubierto que Atg38 (NBRF2 en mamíferos), homodimeriza en su región C-terminal y parece tener un papel fundamental en la estabilización y cohesión del complejo⁷¹.

El complejo de la PI_3K también coopera con el complejo de ATG2-WIP1/2-ATG9, concentrándolo en el omegasoma⁷². PI_3K promueve la movilización de proteínas de unión a PI_3K como WIP1/2, que presumiblemente se encuentra unida a ATG2 de manera PI_3K independiente⁷². Estas dos proteínas, WIP1/2 y

ATG2 son las encargadas del reciclaje del anteriormente mencionado ATG9⁷³. El complejo de la PI₃K no participa en la interacción entre WIPI1/2 y ATG2, pero sí en dirigir y marcar el sitio de unión de este complejo hacia el PI₃P que se encuentra en membranas autofágicas para comenzar la elongación del omegasoma^{72,74}. La unión de WIPI1/2 a las membranas se realiza de forma ATG9-dependiente y servirá de plataforma para unir los dos complejos de conjugación similares a ubiquitina: el complejo de ATG12-ATG16L1-ATG5 y el complejo de ATG8 del que trataremos a continuación.

2.2.3. ELONGACIÓN DEL FAGÓFORO

Una vez terminado el proceso de nucleación, el fagóforo se elonga hasta alcanzar un tamaño adecuado para poder encerrar el cargo. En este punto, WIPI1/2 se encuentra en el omegasoma donde reclutará a ATG16L1 y su sistema de conjugación similar a ubiquitina. La unión de ATG16L1 a WIPI1/2 se produce a través de un dominio adyacente al motivo de unión a FIP200 (FBD) contenido en ATG16L1. Se ha observado que ambas regiones interactoras se encuentran separadas por un codo generado por una prolina, lo que sugiere que ATG16L1 interaccionar simultáneamente con WIPI1/2 y con FIP200⁷⁵. Posteriormente entra en juego el segundo sistema similar a ubiquitina cuya finalidad es la conjugación de ATG8 o LC3 con fosfatidiletanolamina (PE a partir de ahora, por sus siglas en inglés "*phosphatidylethanolamine*"). Se han descubierto varias isoformas de LC3 que se subdividen en la familia de LC3 y GABA receptor-associated protein (GABARAP)⁷⁶.

La finalidad de estos dos sistemas de conjugación es lipidar LC3/GABARAP en compartimentos de doble membrana (marca característica y única de la autofagia canónica) a través de la conjugación de una glicina C-terminal a un fosfolípido de membrana que suele ser fosfatidiletanolamina (PE)⁷⁷, permitiendo así el reconocimiento del cargo a degradar⁷⁸. La lipidación de LC3 funciona

como uno de los sistemas reporteros más usados para estudiar autofagia, debido a que el LC3 lipidado (LC3-II) posee mayor movilidad electroforética que el LC3 sin lipidar (LC3-I). Esto, por tanto, es fácilmente visible en geles de acrilamida⁷⁹. La lipidación de LC3 (con respecto a la de GABARAP) parece ser más importante en la elongación y transporte del fagosoma hacia el lisosoma⁸⁰. Por otro lado, la lipidación de GABARAP podría ser un proceso clave en los pasos de maduración y fusión⁸¹ que veremos más adelante (véase 2.2.4. *Maduración: Transporte y cierre del autofagosoma* y 2.2.5. *Fusión y degradación*).

El primer sistema de conjugación es el formado por ATG12, ATG5 y ATG16L1, así como por dos enzimas que funcionan como proteínas de activación de ubiquitina E1 (ATG7) y conjugadoras de ubiquitina E2 (ATG10). ATG12 se unirá a ATG7 de manera ATP-dependiente (ATG7 hidroliza ATP, formando un enlace tioéster de alta energía entre una glicina C-terminal de ATG12 y la cisteína 507 de ATG7), activando ATG12 y transfiriéndola y uniéndola a la cisteína 133 de ATG10. Ésta última, al funcionar como enzima conjugadora conseguirá formar el dímero ATG12-ATG5 mediante un enlace isopeptídico entre la glicina C-terminal de ATG12 y la lisina 149 de ATG5⁸². Este dímero será capaz de unirse de forma no covalente al tercer miembro del complejo: ATG16L1. Esta proteína tiene la capacidad de oligomerizar formando complejos de hasta 350 kDa en levaduras³⁷ y hasta 800 kDa en mamíferos⁸³. Como se explicó anteriormente, ATG16L1 se une a la membrana externa del autofagosoma gracias a WIPI1/2⁷⁵. Este primer sistema de conjugación es esencial para que se produzca el segundo. Por un lado, el dímero ATG12-ATG5 funciona como E3 ligasa⁷⁰ activando la función de conjugación de ATG3 (que en este segundo sistema tendrá la misma función que ATG10 en el anterior sistema: conjugadora de ubiquitina o E2), promoviendo así la lipidación de LC3 a PE o fosfatidilserina (PS). Por otro lado, ATG16L1 funciona dirigiendo este dímero

(ATG12-ATG5) a la membrana fagosomal y por tanto marcando el sitio de lipidación de LC3⁸⁴.

El complejo de LC3 es el segundo sistema de conjugación existente en el proceso de generación del fagosoma. La enzima ATG7, al igual que en el complejo de ATG12-ATG15-ATG16L1, funciona como E1. Por otro lado, ATG3 tendrá la función conjugadora (E2). Además, como se ha explicado anteriormente, necesitamos el complejo previamente formado (ATG12-ATG5-ATG16L1) que funcionará como complejo ligasa E3 para poder conjugarse PE o PS al LC3⁷⁰. Primeramente, LC3 sufre un procesamiento por parte de ATG4 en la arginina 117, dejando disponible una glicina C-terminal que será capaz de interactuar con la cisteína 507 de ATG7. Esta unión media la transferencia de LC3 a la cisteína 234 de ATG3 (E2). Después de la activación ATG12-ATG5-dependiente de ATG3, se formará un enlace de tipo amida entre el C-terminal de LC3 y el grupo amino de PE⁶⁴. Este proceso, al contrario que el anterior sistema de conjugación, es reversible gracias a la cisteína proteasa ATG4 que será capaz de disociar el LC3-II de la membrana cuando el proceso autofágico finalice⁸⁵.

Actualmente no hay un consenso sobre cómo la célula es capaz de movilizar tanta cantidad de lípidos formadores de membranas. Por ello, se han descrito tres posibles teorías: i) envío de lípidos mediado por vesículas ricas en ATG9, ya que se ha visto que en el proceso de formación del fagosoma, ATG9 trafica desde el retículo hasta las membranas autofágicas en ambos sentidos, lo que podría indicar que funciona como transportador llevando el material necesario para la biogénesis autofagosomal⁸⁶. Incluso hay numerosos estudios que lo relacionan con ERGIC⁵⁶ y con endosomas de reciclaje⁸⁷. ii) directa extrusión de orgánulos ya formados como mitocondrias⁷⁰ y iii) proteínas transportadoras de lípidos.

A pesar de que no está demostrado que esta teoría actúe en la expansión de membrana, hay dos proteínas que podrían estar implicadas en la biogénesis del autofagosoma: GRAM domain-containing 1A (*GRAMD1A*)⁸⁸ y VPS13A. Ésta última tiene gran homología con ATG2, y algunos estudios recientes hipotetizan sobre la posibilidad de que ATG2 pudiese tener una función parecida de transportadora de lípidos^{89,90}. Además, se ha observado la presencia de ATG2 en los sitios de unión entre el retículo y el fagóforo, donde también se encuentra ATG9⁹¹. También se ha visto unido a la translocasa de la membrana externa mitocondrial 40 (*TOM40*)⁹², en sitios de unión del fagóforo y las mitocondrias. Estos estudios sugieren que ATG2 podría ser esencial en la expansión de la membrana.

2.2.4. MADURACIÓN: CIERRE Y TRANSPORTE DEL AUTOFAGOSOMA

Una vez madurado el autofagosoma, éste ha de cerrarse antes de su fusión con el lisosoma. A pesar de que toda la literatura apela a un mecanismo de fusión de membranas, se postula que este proceso de cierre ocurre por escisión de las membranas del autofagosoma⁹³. Se ha observado que unos de los complejos claves son los complejos de sorting endosomal necesarios para el transporte (*Endosomal Sorting Complexes Required for Transport* o *ESCRTs*). Estos complejos de escisión y ligación de membranas se han observado a lo largo del tiempo en la ruta endosomal. Algunos estudios recientes han conseguido ver que el proceso de cierre del fagóforo tiene similitudes con procesos que, de manera tradicional, se han adscrito a la maquinaria ESCRT como la citoquinesis o la formación de cuerpos multivesiculares (*multivesicular bodies* o *MVB*)^{94,95}. También se ha observado cómo células carentes de alguna subunidad de la maquinaria ESCRT acumulan fagóforos que no se han cerrado del todo⁹⁶. Esta convergencia de la ruta endosomal y la autofágica parece tener como nexo de unión la Rab GTPasa 5 (*RAB5*)⁹⁷. Ésta recluta a la subunidad

CHMP4 de la ESCRT-III para unirse a ATG17 (en autofagia no selectiva) o ATG11 (en autofagia selectiva)⁹⁸ que se encuentra en los bordes de los fagóforos abiertos⁹⁶.

Una vez cerrados los autofagosomas, se disocian casi todas las ATGs del fagóforo, excepto el LC3 lipidado⁶⁸ y se transportan hacia el lisosoma, donde ocurre la fusión. También se han visto implicadas en el cierre otras proteínas como ATGs (LC3, GABARAP, ATG2, ATG3, ATG4, ATG5), receptores de proteínas de fijación soluble de NSF (SNAREs) o Rab GTPasas, aunque éstas juegan un papel más importante en la fusión con el lisosoma⁹³ (véase apartado 2.2.5. *Fusión y degradación*).

El transporte de los fagosomas hacia los lisosomas es dependiente del centro organizador de microtúbulos (MTOC) que se encuentra en las inmediaciones del núcleo (localización perinuclear). Diversos estudios postulan que la maduración y transporte del fagosoma ya cerrado se produce de manera pH-dependiente. Los procesos de acidificación y fusión ocurren en la región perinuclear: los autofagosomas formados en la periferia celular se mueven al MTOC, donde se fusionan con lisosomas formando autolisosomas y acidificando su interior⁹⁹. Por su parte, los lisosomas de la periferia celular son alcalinos, lo que conllevará un transporte de éstos hacia la región perinuclear en su maduración, acidificando su interior¹⁰⁰ y fusionándose con autofagosomas. Esta acidificación lisosomal es necesaria dado que la actividad de la mayoría de las enzimas de este orgánulo funcionan a un pH ácido (alrededor de 5)²⁰.

2.2.5. FUSIÓN Y DEGRADACIÓN

Una vez el fagosoma está cerrado, éste puede fusionarse o bien con endosomas tardíos (formando anfisomas que se podrían fusionar más tarde con lisosomas)¹⁹ o bien con lisosomas (formando autolisosomas, la estructura final donde se degradan los cargos). Dado que puede ser difícil conocer el origen

del autolisosoma, muchas veces se emplea el término “*vacuolas autofágicas*” para designar cualquiera de los compartimentos⁶⁴.

Como se discutió en el apartado anterior (véase 2.2.4. *Cierre y transporte del lisosoma*), en la fusión intervienen el sistema de microtúbulos, LC3, proteínas SNARE, ESCRTs, Rab GTPasas y moléculas adaptadoras. Aprovechando el sistema de transporte de la periferia nuclear al MTOC previamente citado, fagosomas y lisosomas unidos a quinesinas o dineínas respectivamente permiten que las vacuolas autofágicas se mantengan próximas a esta red de microtúbulos y entre ellas. Complejos de andamiaje como el complejo de fusión homotípica y sorting de proteínas (HOPS) pueden mantener los compartimentos potenciales de fusión bastante cerca. Se ha demostrado que el LC3 presente en las membranas del fagosoma es capaz de unir el complejo HOPS¹⁰¹. Como se explicó anteriormente (véase apartado 2.1.1. *El complejo mTOR y vías dependientes*) LC3 se une a ATG4 para su reciclaje. Este LC3 debe ser eliminado de las membranas del fagosoma antes de la fusión debido a que la presencia del dímero LC3/ATG4 genera restricciones espaciales que impiden la fusión con el lisosoma¹⁰². Las Rab GTPasas también son moléculas clave en este proceso. En concreto Rab7 puede interactuar con compartimentos Rab2 o Rab7 positivos como endosomas o lisosomas¹⁰³. Se ha observado otras Rab GTPasas que pueden participar en este proceso como Rab2¹⁰⁴, Arl8B¹⁰⁵, Rab24¹⁰⁶ o Rab33B¹⁰⁷ mediante su interacción con el complejo HOPS.

Gracias al complejo de andamiaje HOPS^{108,109,110}, se ensamblarán complejos de proteínas SNARE. Por ejemplo, la syntaxina 17 (*STX17*) se puede unir a ATG14, reclutando otras proteínas SNARE como SNAP29 y VAM8, moléculas implicadas en la fusión de membranas¹¹¹. Una vez formado el autolisosoma, se degrada la membrana interna, permitiendo la digestión del cargo por las enzimas contenidas en el lisosoma.

A continuación se muestra un esquema representativo de los pasos y sistemas claves del proceso de formación del autofagosoma antes de su transporte y fusión con el lisosoma (Figura 2).

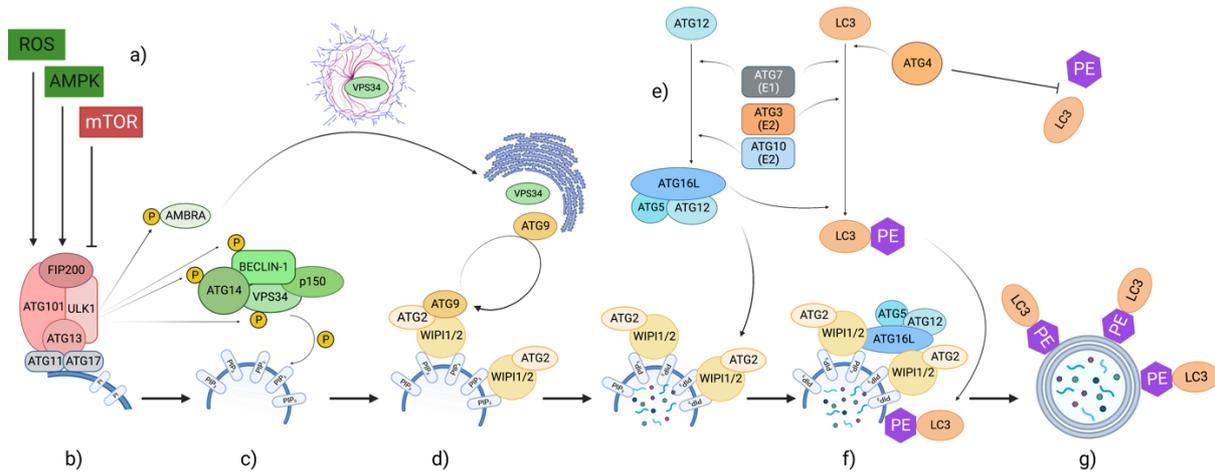


Figura 2. Esquema de la formación del autofagosoma antes de transportarse y fusionarse con los lisosomas. **a)** Algunos de los inductores o inhibidores más estudiados de la autofagia. **b)** El complejo de ULK1 (proteínas en tonos rojos) es el encargado del proceso de iniciación en el PAS (estructura preautofagosomal). **c)** ULK1 fosforila AMBRA y otras proteínas pertenecientes al complejo de la PI₃K de clase III (mostradas en tonos verdes) como ATG14, Beclin-1 y VPS34, haciendo que esta última convierta el PI del omegasoma en PIP₃. **d)** El PIP₃ funciona como plataforma para que WIPI1/2 se reclute en la membrana en expansión, esto funciona a su vez de plataforma a su vez para que ATG9 vaya trayendo membrana desde el retículo (aunque esto no está demostrado), así como para que el complejo de conjugación de ATG12 se ancle en la membrana. **e)** Mediante ATG7 y ATG10, se genera el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 (mostrado en tonos azules) que servirá a su vez de E3 ligasa para el otro sistema de conjugación de LC3 (a su derecha, en tonos naranjas). ATG7 funciona como E1 activadora de ubiquitina en ambos sistemas y por ello aparece en gris **f)** El LC3 conjugado a PE (LC3-PE) se ancla al autofagosoma en formación. **g)** Tras el cierre del autofagosoma, todas las proteínas autofágicas (ATGs) se desvinculan de este, excepto el LC3-PE. Este hecho es el que hace al LC3 uno de los marcadores más utilizados en el estudio de vacuolas autofágicas.

3. AUTOFAGIA SELECTIVA

Numerosos estudios han demostrado la existencia de un tipo de autofagia que degrada cargos específicos como pueden ser microorganismos invasores, orgánulos dañados o agregados proteicos. Se ha visto que, dependiendo del tipo de cargo, la maquinaria reclutada es diferente en cada caso. Estos procesos se englobarán bajo el término autofagia selectiva, ya que son específicos del cargo que incorporan para degradar.

Además de su función en la formación del fagosoma en la autofagia no selectiva (véase apartado 2.2.3. *Elongación*), LC3-PE tiene un papel fundamental en el secuestro de cargos en la autofagia selectiva cuando éste se encuentra unido a la membrana interna del fagóforo (lo que ayudará en la encapsulación del cargo)¹¹². Este proceso está mediado por unas proteínas adaptadoras contenedoras de un dominio de interacción a LC3 (LIR). Este motivo se descubrió por primera vez en p62 (también conocido como *sequestosoma-1* o *SQSTM1*)¹¹³. Aunque inicialmente se encontró un dominio de unos 15 aminoácidos, estudios posteriores consiguieron encontrar el motivo mínimo necesario para que el LIR se mantuviese funcional: un triptófano seguido de una leucina con una separación de dos aminoácidos, preferentemente ácidos, (WXXL)¹¹⁴. Las proteínas adaptadoras funcionan como nexo entre el cargo a degradar marcado con ubiquitina y el LC3 lipidado. Todas las proteínas adaptadoras poseen tres dominios: i) dominio LIR ii) dominio de unión a ubiquitina y iii) dominio de dimerización o multimerización¹¹⁵.

Desde entonces, se han descubierto gran cantidad de proteínas que contienen este motivo, como son p62/SQSTM1^{116,117}, proteína de puntos nucleares 52 (*NDP52*)^{118,119}, optineurina (*OPTN*)^{120,121}, proteína 1 junto al gen *BRCA1* (*NBR1*), proteína de unión a Tax1 (*Tax1 binding protein* or *TAX1BP1*)¹²², dominio 1 de unión a almidón (*Stbd1*)¹²³, receptor de reticulofagia 264 expresado en testículo (*TEX264*)¹²⁴ o el receptor X1 similar a NOD (*NLRX1*)¹²⁵.

Cada una de ellas funciona en un proceso de autofagia selectiva diferente y también cargo-dependiente. Recientemente se ha descubierto que la degradación selectiva de proteínas implicadas en el inflammasoma o en la señalización por interferón son reconocidas por GABARAP, en este caso se ha visto que la proteína adaptadora es TRIM16 y funciona de manera p62-independiente¹²⁶.

A continuación se clasificarán los distintos tipos atendiendo al cargo que engloban.

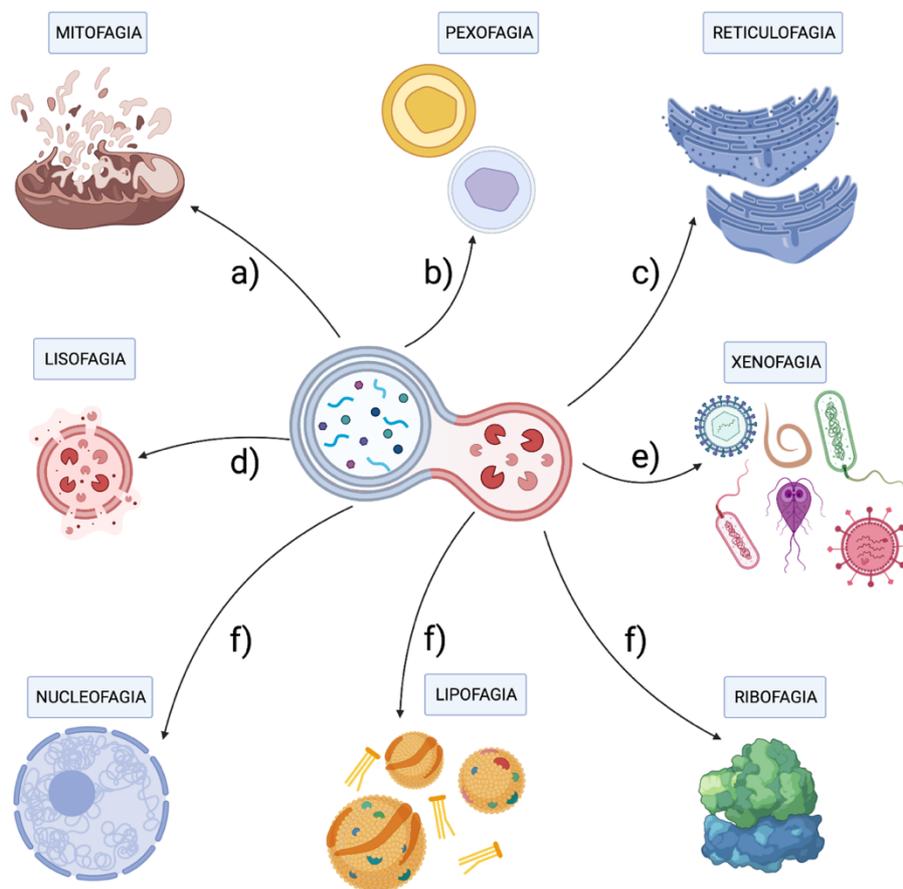


Figura 3. Tipos de autofagia selectiva dependiendo del cargo a degradar. A) Degradación de mitocondrias o mitofagia. **B)** Degradación de peroxisomas o pexofagia. **C)** Degradación de retículo plasmático o reticulofagia. **D)** Degradación de los propios lisosomas o lisofagia. **E)** Degradación de microorganismos potencialmente patógenos como virus, bacterias o parásitos o xenofagia. **F)** Otros tipos de autofagia como la nucleofagia, la lipofagia o la ribofagia.

3.1. MITOFAGIA

La degradación selectiva de mitocondrias (Figura 3a) es un fenómeno bastante estudiado dada la función tan importante que cumplen en el estado metabólico y energético de la célula, así como su papel en muerte celular programada^{10,127,128}. Estímulos de estrés celular como hipoxia, aparición de ROS o inhibidores de la cadena respiratoria mitocondrial pueden promover la mitofagia. Hay dos proteínas que están implicadas en este proceso: la serín/treonín quinasa PINK1 (quinasa 1 putativa inducida por PTEN) y la E3 ligasa de ubiquitina PRKN (proteína RBR E3 ubiquitina ligasa de parkina). Las vías de la mitofagia pueden clasificarse entonces como PINK1-PRKN-dependiente o independiente.

De manera fisiológica, PINK1 se asocia a la membrana externa de las mitocondrias (*OMM*) para su posterior translocación a la membrana interna (*IMM*) por las translocasas TOMM y TIMM23. La despolarización de la membrana inhibe esta translocación de PINK1. Esto promueve tanto su autofosforilación como la fosforilación de residuos de ubiquitina que, posteriormente reclutarán a PARK2. Esta última se transporta a la *OMM* donde se fosforila y se activa. Comenzará entonces a añadir fosfo-ubiquitinas a proteínas de la membrana externa como son el canal de aniones dependiente de voltaje (VDAC)¹²⁹ o las mitofusinas (*MFN1/2*)¹³⁰. Estas poli-ubiquitinaciones acaban por reclutar a p62 y OPTN entre otras proteínas adaptadoras que posteriormente reclutarán LC3¹³¹. Estas proteínas adaptadoras también son activadas para inducir mitofagia gracias a la activación de la quinasa de unión a TANK1 (*TBK1*)¹³². Recientemente se ha visto que proteínas de la *IMM* como prohibitina 2 (*PHB2*) también median mitofagia de una manera PARKN dependiente¹³³.

Por otro lado, la vía independiente se produce a través de proteínas BH3-only como proteína similar 3 de interacción a BCL2 (*Nix/BNIP3L*), proteína 1 contenedora de motivo FUN14 (*FUNDC14*) o proteína de interacción a BCL2

(*BNIP3*). Éstas interactúan directamente a través de su dominio LIR con LC3¹³⁴. El regulador de autofagia y beclin-1 (*AMBRA1*) puede funcionar en ambas vías ya que, además de ser un interactor de parkina¹³⁵, contiene un motivo LIR¹³⁶.

3.2. PEXOFAGIA

El peroxisoma es el orgánulo encargado del metabolismo de ROS y del metabolismo de lípidos. Éstas últimas son moléculas indispensables para la formación de membranas entre otras funciones. Por tanto, es fundamental que haya una estricta regulación en la biogénesis y degradación de este orgánulo (Figura 3b). Aunque actualmente no se ha encontrado ninguna proteína específica de pexofagia en mamíferos, si se ha demostrado la participación de algunos factores de biogénesis peroxisomal PEX2¹³⁷, PEX3¹³⁸, PEX5¹³⁹ o PEX14¹⁴⁰ en procesos de degradación selectiva de este orgánulo. Todos los estudios realizados indican una intervención esencial de las proteínas adaptadoras NBR1 y SQSTM1¹⁴¹.

3.3. AGREFAGIA

Hay tres principales sistemas encargados de la degradación de proteínas: la autofagia mediada por chaperonas o CMA (véase apartado 1.2. *Tipos de autofagia*), el sistema de proteasoma-ubiquitina o UPS y la autofagia selectiva de agregados proteicos o agrefagia¹⁴². El sistema de proteasoma ubiquitina (UPS) se encarga de la degradación de proteínas de vida media corta mal plegadas o dañadas. Cuando estas proteínas contienen secuencias, por ejemplo, de poli-glutamina o poli-alanina, se forman estructuras aberrantes que son proclives a formar agregados que serán reconocidos por el sistema de degradación lisosomal para ser eliminados. En ambos casos, las proteínas son previamente marcadas con cadenas de ubiquitina. Estos agregados pueden ser monómeros solubles o pequeños agregados e incluso llegar a convertirse en

verdaderos cuerpos insolubles en el citoplasma que pueden ser citotóxicos. De hecho, muchos agregados proteicos son responsables de diversas patologías como enfermedades neurodegenerativas, musculares o del hígado entre otras (véase apartado 5. *Fisiopatología asociada a la autofagia*).

El agregado proteico también puede denominarse agresoma, una estructura que se encuentra en el MTOC (véase apartado 2.2.4. *Cierre y transporte del fagosoma*), cuyas proteínas están ubiquitinadas y rodeadas de filamentos intermedios como vimentina o queratina¹⁴³. También se han encontrado en este agresoma proteínas como p62, NBR1, OPTN o TAX1BP1 lo que hace pensar que estas proteínas participan tanto en la creación como en la degradación de estos agregados. El proceso clave en la agrefagia es la interacción de p62 con FIP200, la cual forma parte del complejo de ULK1 y que por tanto, formará el autofagosoma directamente en los agregados proteicos¹⁴⁴. Recientemente se ha encontrado una chaperonina denominada CCT2, la cual funciona como proteína adaptadora (se une a LC3 a través de un motivo LIR), sin necesidad de que el cargo este ubiquitinado y por tanto de manera NBR1 o p62-independiente¹⁴⁵.

3.4. RETICULOFAGIA

El retículo endoplasmático es el principal encargado de la biosíntesis de lípidos y del plegamiento y modificaciones de las proteínas y membranas celulares. Funciona también como reservorio de calcio celular¹⁴⁶.

Los mecanismos más estudiados de degradación del retículo son: i) Degradación asociada al ER (*ERAD*): un proceso que involucra la traslocación de proteínas defectuosas al citoplasma para su degradación por el sistema de ubiquitina-proteasoma (UPS) y ii) La respuesta a proteínas mal plegadas (*UPR*): proceso en el que participa la maquinaria autofágica y que actúa como un segundo mecanismo en caso de fallar el primero¹⁴⁷.

Las principales proteínas adaptadoras implicadas en reticulofagia (Figura 3c) son FAM134B que se encarga de las regiones más planas del retículo¹³, un splicing alternativo de la proteína reticulón 3 (*RTN3L*) que, por el contrario se encarga de las regiones tubulares¹⁴⁸ y la proteína translocadora SEC62 que se encarga del exceso de membrana producido tras la UPR¹⁴⁹ y la degrada por microautofagia¹⁵⁰. Además, se ha visto que la proteína FAM134B juega un papel fundamental en xenofagia¹⁵¹ (véase el apartado 3.7. *Xenofagia*).

3.5. FAGOCITOSIS ASOCIADA A LC3 (LAP)

La fagocitosis asociada a LC3 es un tipo de autofagia no canónica observado en células fagocíticas como macrófagos o células dendríticas. En estas células se observan autofagosomas marcados con LC3 que contienen material fagocitado. Este proceso se ha visto implicado en la eliminación de bacterias fagocitadas, funcionando al igual que la xenofagia como una barrera antimicrobiana celular¹⁵². LAP comparte muchas características con la autofagia canónica ya que los dos sistemas de conjugación de ubiquitina encargados de la lipidación y anclaje del LC3 a las membranas son los mismos¹⁵³. Las diferencias entre la autofagia canónica y LAP radican en la activación de los sistemas de conjugación: a pesar de que ambas utilizan la maquinaria del complejo de la PI₃K, en LAP al contrario que en la autofagia canónica, la activación de éste se produce de manera ULK-1 independiente. La activación de la PI₃K en LAP viene determinada por la estimulación de diferentes receptores de superficie como receptores de tipo Toll (TLRs), receptores de inmunoglobulina G (IgG) o lectinas^{154,155}. La estimulación de estos receptores genera el PI₃P necesario para activar la PI₃K y comenzar la elongación del autofagosoma. Una de las marcas distintivas del complejo de la PI₃K en LAP es la asociación de la proteína Rubicon, dicha interacción no ocurre en la autofagia canónica.

3.6. LISOFAGIA

El lisosoma a pesar de funcionar como principal orgánulo degradativo también puede dañarse y por tanto ser susceptible a autofagia selectiva. Este proceso se denomina lisofagia y comienza con la permeabilización de la membrana lisosomal (referida como LMP a partir de ahora). La LMP es el proceso por el cual se pierde la integridad de la membrana lisosomal con la consecuente traslocación de proteínas luminales al citoplasma. Esto da lugar a la pérdida de la función lisosomal debido tanto a la fuga de los protones (encargados de mantener el lumen lisosomal en un pH ácido para la correcta actuación de las proteasas) como a la liberación de enzimas (como las catepsinas) al citoplasma. Esto no solo afectaría negativamente a todos los procesos autofágicos de degradación y reciclaje (ya que la propia herramienta del sistema autofágico está dañada), sino que también podrían causar la muerte de la célula^{156,157,158}. Así, el término lisofagia se presenta como un proceso para el control de calidad del orgánulo principal de la autofagia: el lisosoma¹⁵ (Figura 3d).

Numerosos estudios observaron la translocación de diferentes galectinas a vesículas autofágicas contenedoras de microorganismos patógenos^{159,160}. Por ello, se empezaron a desarrollar los ensayos basados en el uso de galectinas como reporteras de daño lisosomal¹⁶¹. Éstas son unas proteínas solubles pertenecientes a la familia de las lectinas, capaces de interactuar con carbohidratos como los β -galactósidos gracias a unos dominios llamados CRDs (carbohydrate recognition domains)¹⁶². Ante la pérdida de permeabilidad lisosomal las galectinas serán capaces de reconocer la β -galactosidasa previamente translocada en el citoplasma debido a la ruptura de la membrana¹⁶³. Una vez unida la galectina al lisosoma dañado, se formará un complejo con la proteína de motivo tripartito 16 (TRIM16)¹⁶⁴ o se degradarán por el complejo de las ESCRT^{165,166}.

Otros inductores de lisofagia pueden ser entidades vivas como infecciones bacterianas^{167,168} o víricas^{169,170} o entidades inertes como compuestos químicos^{171,172,173}, así como la exposición de las células a cambios bruscos de osmolaridad en el medio son capaces de producir daño lisosomal, confirmado por la formación de vesículas de diferentes glectinas vistas por microscopía confocal¹⁵⁹.

3.7. XENOFAGIA

Hasta hace poco menos de 20 años, la autofagia solo parecía encargarse de reciclar el material celular dañado, pero fue en 2004 cuando un estudio reveló la implicación de esta vía en el control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos¹⁷⁴. Esto hizo posible la caracterización de la autofagia como mecanismo de defensa innata frente a patógenos. Se denomina xenofagia al proceso por el cual la autofagia actúa en la eliminación de microorganismos invasores potencialmente dañinos como parásitos¹⁷⁵, virus¹⁷⁶ o bacterias¹⁷⁶, evitando así su replicación y colonización celular¹⁷⁷ (Figura 3e).

No obstante, algunos microorganismos son capaces de evadir estos sistemas y utilizar la maquinaria autofágica en su propio beneficio. Este es el caso de parásitos como *Leishmania spp*¹⁷⁸ y *Trypanosoma cruzi*¹⁷⁹, coronavirus¹⁸⁰ y flavivirus como el virus del Dengue o el virus del Nilo Oriental¹⁸¹ o bacterias como *Listeria monocytogenes*¹⁸², *Shigella flexneri*¹⁸³ y *Staphylococcus aureus*¹⁸⁴.

Otros microorganismos, por el contrario, utilizan el retículo endoplasmático como lugar de replicación, así que no es de extrañar que proteínas como FAM134B, encargadas del reciclaje de las zonas planas del retículo¹³ (véase apartado 3.4. *Reticulofagia*) sean claves en la degradación de virus con tropismo por el retículo como el virus del Ébola¹⁵¹. Por ello, muchos flavivirus han desarrollado mecanismos para contrarrestar el efecto xenofágico de FAM134B,

inactivándola y, por tanto, inhibiendo la reticulofagia, pudiendo así usar el sistema de endomembranas del retículo para su replicación y supervivencia¹⁸¹.

Como en el resto de tipos de autofagia selectiva, aquí participan también proteínas adaptadoras como p62¹¹⁷, NOD1/2¹⁸⁵, NDP52¹¹⁹, TAX1BP1^{119,122} o OPTN¹²¹ que reconocerán las cadenas de ubiquitina asociadas al microorganismo cuando éste es liberado al citosol. Por otro lado, las membranas lisosomales rotas que lo contenían serán reconocidas por galectinas¹⁵⁹ (véase apartado 3.6. *Lisofagia*). Previo trabajo del laboratorio estudió el papel de una proteína transmembrana llamada TMEM59 (véase apartado 4. *Autofagia no canónica*). Ésta contiene un dominio de unión a ATG16L1 a través del que promueve la lipidación de LC3 en las propias membranas donde se encuentra¹⁸⁶. Este fenómeno ha sido observado en procesos de xenofagia en respuesta a infecciones de *Staphylococcus aureus*¹⁸⁶. En estos estudios se observó una fuerte co-localización entre TMEM59 y compartimentos LC3 positivos que contenían la bacteria. Esta co-localización no se observó en infecciones con bacterias Gram negativas (Gram -) como *Salmonella* (no publicado). Además, en infecciones con *S. aureus*, la depleción de TMEM59 bloqueaba la lipidación de LC3-II producida como respuesta ante esta infección. Estos resultados sugerían un papel degradativo de TMEM59 mediante el marcaje con LC3-II de las vesículas que contenían *S. aureus*. Una parte de este trabajo se centrará en averiguar si TMEM59 pudiera estar involucrado también en la respuesta autofágica frente a otras bacterias Gram + como *Streptococcus pyogenes* (véase *Resultados Capítulo 3: TMEM59 y su papel en xenofagia*).

3.8. OTROS TIPOS

A pesar de que el núcleo (Figura 3e) es un orgánulo fundamental en la célula, la degradación y reciclaje de éste es un proceso muy poco estudiado en mamíferos. Solo se ha descrito la degradación de lamina B1 (*LAMNB1*) a través

de la interacción con LC3 en un proceso protector contra la senescencia y la tumorigénesis¹⁸⁷. La degradación del núcleo se ha observado más detalladamente por procesos de microautofagia (véase el apartado 1.2. *Tipos de autofagia*).

La lipofagia es otro tipo de autofagia selectiva que se encarga de la degradación de gotas lipídicas libres en el citoplasma como colesterol o triglicéridos entre otros (Figura 3e). Se ha observado que una de las familias de proteínas clave en este proceso son las perilipinas (*PLINs*)¹⁸⁸. También se han observado fenómenos de microlipofagia¹³⁶ (véase apartado 1.2. *Tipos de autofagia*).

En el proceso de síntesis de proteínas, los ribosomas juegan un papel fundamental, por lo que la degradación de estos afectará directamente a la regulación de la síntesis y degradación de proteínas. El proceso de eliminación selectiva de ribosomas se conoce como ribofagia¹⁸⁹ (Figura 3e). Pese a que este proceso no ha sido muy estudiado hasta la fecha, se ha descubierto que la proteína de interacción a FMR1 nuclear (*NUFIP1*) es capaz de interactuar con LC3 e inducir ribofagia de las subunidades 60S de los ribosomas, aunque no se conozca exactamente el ligando¹².

Otros tipos de autofagia selectiva podrían ser la ferritinofagia o la glicofagia¹⁹⁰.

4. AUTOFAGIA NO CANONICA

Toda la maquinaria anteriormente descrita (véase apartado 2. *Maquinaria de generación del fagosoma*) refiere a los procesos de autofagia canónica, cuya finalidad es conjugar LC3 al PE de las membranas del autofagosoma (compartimentos de doble membrana) para eliminar el cargo contenido en estos. Es decir, ya sea autofagia selectiva o no selectiva, la función que cumple es meramente degradativa³. No obstante, se han descrito diferentes fenómenos

no relacionados con autofagia pero sí dependientes de proteínas autofágicas, en los que compartimentos ya formados de la ruta endolisosomal como endosomas o fagosomas, siempre de membrana sencilla¹⁹¹, se decoran con LC3 lipidado. La finalidad de estos procesos puede ser degradativa (ante infecciones víricas por el virus Influenza A, fagocitosis asociada a LC3 (LC3 associated phagocytosis o LAP)¹⁵⁴ o procesos de entosis o micropinocitosis¹⁹²) o tener un objetivo completamente independiente de degradación como ante determinados patógenos (véase apartado 3.7. *Xenofagia*). Dentro del término “autofagia no canónica” se engloban tanto los procesos degradativos en vacuolas autofágicas de membrana sencilla, como los procesos no degradativos en vacuolas autofágicas de doble membrana¹⁹¹.

Además, la participación jerárquica de todas las diferentes proteínas autofágicas no se cumple en los procesos no canónicos debido a que ocurren en una vacuola preexistente. Por esto, los efectores autofágicos como el nodo de ATG16L1 o el complejo de lipidación de LC3 (ATG3, ATG4, ATG7 y LC3) son capaces de dirigir la conjugación de LC3 a compartimentos de membrana sencilla (CASM). Por el contrario, en la autofagia canónica, la generación *de novo* del fagosoma exige la participación de los reguladores implicados en la formación de autofagosomas. Éstos son los complejos que se encuentran regulados por mTOR como WIPI1/2 (ATG18)¹⁹³ o el complejo ULK1 (FIP200-ULK1-ATG13)^{192,194}.

Históricamente, la conjugación del LC3 se ha producido a fosfatidiletanolamina (PE), aunque estudios recientes abogan que LC3 podría conjugarse a fosfatidilserina (PS) en la CASM. Esto convertiría al LC3 conjugado con PS en otra marca distintiva más de la autofagia no canónica. Si bien es cierto que esto solo se ha demostrado *in vitro* como respuesta a LAP, infección por influenza virus tipo A o inducido farmacológicamente por drogas como la monensina^{194,195}, hay otros procesos de autofagia no canónica que todavía

deberían ser revisados para observar si el LC3 se conjuga con PE o PS¹⁹⁴. Otra prueba más de que podría existir esta dicotomía es la delipidación específica que observamos con las isoformas de ATG4 (enzima deconjugadora que libera el LC3 del lípido en cuestión). Mientras que LC3-PE es sensible a las cuatro isoformas conocidas de ATG4 (ATG4A/B/C/D), la delipidación de LC3-PS parece ser ATG4D dependiente, con cierta contribución por parte de ATG4B también. Esto implica cierto grado de especificidad en comparación con la delipidación de LC3-PE¹⁹⁵.

Como se explicó anteriormente (véase apartado 2.2.3. *Elongación*), la proteína autofágica Atg16 en levaduras (Figura 4a) forma complejos de unos 350 kDa, mientras que su homólogo en mamíferos (*ATG16-like protein 1* o ATG16L1) es capaz de formar los mismos complejos, aunque estos son de 800 kDa. Además, se ha observado la existencia de un dominio C-terminal exclusivo de mamíferos que se denominó WDD (*WD40-repeat domain*, dominio WD o WDD)⁸³ (Figura 4b). Este dominio parece estar involucrado en mecanismos más especializados e independientes de la ruta canónica, ya que formas truncadas carentes del WD40 no impactan en este tipo de autofagia¹⁹⁶, pero sí afectan a la no canónica¹⁹⁷. Además, las levaduras carecen de esta región y mantienen una correcta autofagia canónica¹⁹⁸. Asimismo, mutaciones en el dominio FBD de unión a FIP200 desestabilizan la autofagia canónica¹⁹⁹ (véase apartado 2.2.3. *Elongación*) mientras que esta autofagia no convencional se mantiene intacta. Esto sugiere que estos dos tipos de autofagia (canónica y no canónica) están controladas por regiones diferentes de ATG16L1. Muy cerca de este dominio se encuentra el residuo treonina 300 (T300), cuya mutación a alanina incrementa el riesgo de sufrir la enfermedad de Crohn²⁰⁰. Esta mutación hace más susceptible a ATG16L1 al procesamiento por caspasas en una diana vecina. Este corte desestabiliza la ruta no canónica, sugiriendo que a pesar de que estén presentes ambos fragmentos aislados entre sí (N-terminal y C-terminal o WDD), es

necesario que ATG16L1 se mantenga intacta para soportar esta vía²⁰¹. Esta inhibición de la ruta no canónica se traduce en una pérdida de xenofagia y aumento de la respuesta inflamatoria²⁰². Dado el fenotipo que presenta el alelo A300, se postula que el dominio WD de ATG16L1 podría haber aparecido en eucariotas superiores para regular funciones más específicas como la eliminación de microorganismos patógenos.

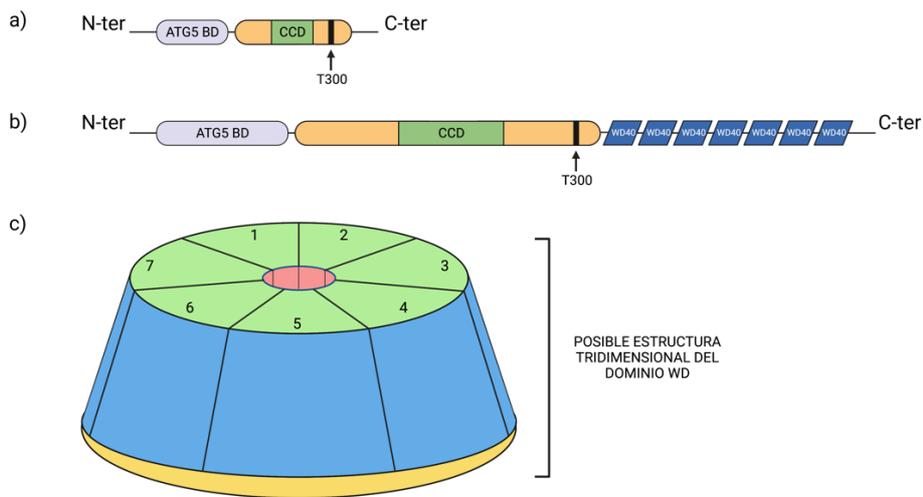


Figura 4. Estructura del dominio WD de ATG16L1. **a)** Esquema representativo de la proteína Atg16 en levaduras. **b)** Esquema representativo de la proteína ATG16L1 (homóloga de Atg16) en eucariotas con el dominio WDD en su región C-terminal. **c)** Disposición tridimensional del dominio WDD. Los números indican el número de repeticiones del WD40. Los colores representan las diferentes superficies interactoras que podrían funcionar simultáneamente.

El dominio WD se encuentra en todos los eucariotas y parece funcionar como plataforma de interacción para proteínas y ligandos. Consiste en 7 repeticiones de dominios WD40 dispuestos todos enfrentados formando una estructura tipo barril con un poro central. Cada dominio está formado por cuatro hebras β (β -strands) unidas por laminas- β antiparalelas²⁰³. Su disposición de barril y el hecho de que haya siete repeticiones de WD40, sugiere que podría unir numerosas moléculas de manera simultánea debido a la gran superficie potencialmente

interactora (Figura 4c). La identificación de proteínas capaces de interactuar con este dominio serviría para dilucidar las posibles funciones específicas anteriormente mencionadas.

Recientemente se ha descrito un fenómeno de lipidación de LC3 como mecanismo de “defensa” ante un desbalance de protones, y por tanto, de pH en algún compartimento de la vía endolisosomal²⁰⁴. Este fenómeno es independiente de los procesos de autofagia canónica y ocurre en compartimentos de membrana sencilla (CASM). Se ha observado que este proceso depende de la ATPasa vacuolar, v-ATPasa o H⁺-ATPasa: un complejo multimérico en el que se diferencian dos grandes porciones: i) uno citoplásmico llamado V₁ (Figura 5b) con función catalítica de ATP que contiene sitios de unión a este (*ATP binding sites*) y ii) otro embebido en la membrana lisosomal denominado V₀ (Figura 5a) que actúa como rotor para la translocación de protones al interior gracias a la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP por parte de la V₁²⁰⁵. De manera fisiológica, la V₁ se encuentra soluble en el citoplasma, y ante ciertos estímulos como la necesidad de acidificación de los lisosomas, se recluta a la membrana lisosomal y se acopla la subunidad V₀ (Figura 5c). Una vez ensamblada, es capaz de unir ATP a través de los dominios previamente citados para hidrolizarlo, generando una energía capaz de iniciar la rotación del subcomplejo V₀ para que comience la entrada de protones. Por un lado, la V₁ forma un hexámero que consta de tres copias de la subunidad V₁A y otras tres copias de la subunidad V₁B dispuestas alternadamente formando un poro central donde encaja la subunidad V₁C. Ésta junto con la subunidad F y la subunidad “d” de la V₀ forman el tronco de unión de ambos subcomplejos²⁰⁵. Por otro lado, tenemos la porción V₀ que consta de otro hexámero embebido en la membrana formando un poro central. Este hexámero está constituido por las subunidades c, c' y c'' (Figura 5a). Asociado a esta estructura encontramos la subunidad V_{0a}, la cual contiene dos prolongaciones, una que contacta con las

subunidades C y H, que a su vez están unidas a la subunidad F formadora del tronco central²⁰⁶ (Figura 5d), y otra que contacta con una región distal de la subunidad V₁A llamada región no homóloga²⁰⁷. En la subunidad V₀a se encuentra el poro por el que se produce la translocación de los protones²⁰⁸.

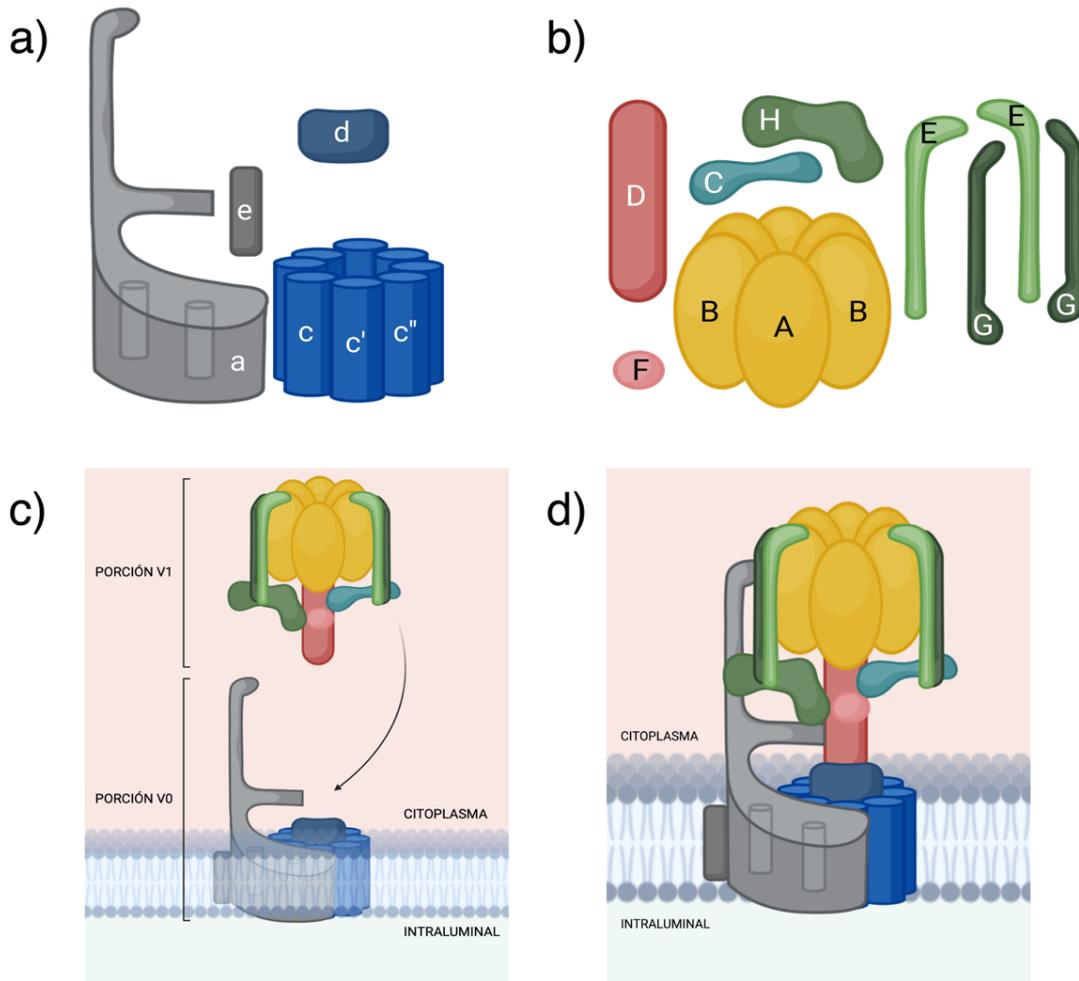


Figura 5. V-ATPasa. a) Se muestran todas las subunidades conocidas de la porción V_0 , la cual está anclada a la membrana lisosomal. Ésta consta de una subunidad V_{0a} grande a la que está unida la subunidad V_{0e} . El rotor central está formado por un hexámero que contiene dos copias de cada una de las subunidades V_{0c} , $V_{0c'}$ y $V_{0c''}$. Por último, tenemos la subunidad V_{0d} la cual se encuentra dispuesta encima del poro central formado por el hexámero previamente citado. Todas las subunidades de la V_0 se nombran con letras minúsculas. **b)** Se muestran todas las subunidades conocidas de la porción V_1 , la cual se encuentra libre en el citoplasma. Ésta consta de un hexámero central que contiene tres copias de cada una de las subunidades V_{1A} y V_{1B} . El eje o rotor central lo forman las subunidades V_{1D} y V_{1F} , este eje es el encargado de acoplarse a la V_0 , la estabilización de este acoplamiento se produce gracias a las subunidades V_{1C} y V_{1H} que son las encargadas de interactuar con la V_{0a} en el proceso. Por último, nos encontramos con otras proteínas estabilizadoras como son las V_{1G} y V_{1E} . Todas las subunidades de la V_1 se nombran con letras mayúsculas. **c)** Esquema de ambas porciones desensambladas en su estado natural. El acoplamiento se produce ante una necesidad fisiológica o un estímulo como podría ser la monensina, droga que se utilizó como activador de autofagia no canónica en el *Capítulo 2 de Resultados*. **d)** Esquema final de la v-ATPasa ensamblada.

La consecuencia más inmediata para la célula ante el desbalance de pH es intentar combatirlo mediante el ensamblaje de las dos porciones de la v-ATPasa (V_0 y V_1), de manera independiente a la actividad acidificadora de esta (*pump activity*). Esto se ha visto al estudiar que algunas drogas como la cloroquina elevan el pH luminal²⁰⁹ pero no inhiben la CASM, sino que la potencian¹⁹⁴. Esta asociación, independientemente de la *pump activity* promueve lo que se conoce como lipidación de LC3 mediada por la unión de la v-ATPasa y ATG16L1 (VAIL). Se postulan así el WDD de ATG16L1 y la v-ATPasa como reguladores universales de la autofagia no canónica²¹⁰. Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en los últimos años^{211,212} y se ha observado que el dominio interactor de ATG16L1 con la v-ATPasa es el anteriormente mencionado WDD. Se conocen varios residuos de este dominio que están implicados en la interacción con la v-ATPasa y, por tanto, en VAIL como la asparagina 453 (N453), la fenilalanina 467

(F467) y la lisina 490 (K490)²¹⁰. La mutación de estos residuos mantiene intacta la autofagia canónica, mientras que surgen defectos de la ruta no canónica como los observados en LAP o en la activación del LC3 inducido por monensina^{193,213,214}. Además, la estructura cristalográfica del WDD²⁰³ ha ayudado a averiguar que a pesar de estar separados por 23 aminoácidos en la estructura primaria, la estructura terciaria enfrenta estos aminoácidos formando una especie de bolsillo en la parte superior del dominio¹⁹³ donde podrían asociarse diversos interactores, entre ellos, la ya demostrada v-ATPasa.

Hasta la fecha, la evidencia más clara en cuanto a la función de esta interacción la proponen Yue Xu et. al, al descubrir una proteína bacteriana en *Salmonella* llamada SopF que parece capaz de abrogar la interacción entre v-ATPasa y ATG16L1, ribosilando la glutamina 124 (Q124)²¹² de la subunidad V₀c de la v-ATPasa, y por tanto, inhibiendo la autofagia no canónica.

5. FISIOPATOLOGÍA ASOCIADA A AUTOFAGIA

Dada la cantidad y diversidad de procesos en los que la autofagia está implicada, es lógico pensar que su desregulación intervenga en la aparición de numerosas enfermedades como enfermedades cardiovasculares^{215,216}, respiratorias^{217,218}, cáncer^{219,220}, neurodegenerativas, metabólicas o infecciosas entre otras¹⁷. También se ha observado un papel fundamental de la autofagia en la fibrosis quística por defectos en xenofagia y secuestro de Beclin1 y su interactoma.

5.1. CÁNCER

A pesar de que, de manera natural, la autofagia parece jugar un rol protector ante los diversos estímulos pro-oncogénicos que pueden darse en la célula debido a su función de reciclaje y degradación de productos nocivos para la célula²²¹, la autofagia también parece ayudar a determinados tipos de cáncer

en su progresión^{222,223}. Se sabe que la autofagia tiene una doble función dependiendo del estadio de la enfermedad. Así, en estadios tempranos del proceso cancerígeno, la autofagia tendría un papel de supresión de tumores²²⁰. Por otro lado, en fases más avanzadas de la enfermedad tiene una función pro-tumorigénica^{222,223,224}. En este último caso, se ha observado como la autofagia podría estar involucrada en ayudar a células con baja disponibilidad de recursos energéticos y oxígeno a mantenerse dentro del nicho del tumor^{225,226}. También se ha observado como la autofagia podría aumentar tanto la resistencia a la quimioterapia²²⁷ como la agresividad de los tumores, promoviendo procesos metastásicos^{228,229}.

5.2. INMUNIDAD INNATA Y AUTOINMUNIDAD

En términos de inmunidad, se han visto gran variedad de reacciones inmunes innatas dependientes de autofagia. Por ejemplo, como se ha explicado antes, la autofagia juega un papel fundamental tanto en la defensa como en la progresión de la infección de microorganismos patógenos (véase apartado 3.7. *Xenofagia*) como *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* o *Staphylococcus aureus* entre otros.

Recientemente y en conexión con este papel en xenofagia, numerosos estudios postulan que el intestino funcionaría como órgano inmune ya que actúa como primera barrera ante microorganismos potencialmente patógenos, tanto comensales propios como exógenos ingeridos a través de la comida^{230,231}. Esto se explicará con más detalle en el apartado 5.5. *Enfermedad Inflamatoria Intestinal*.

La autofagia no solo tiene una función ante antígenos exógenos, sino que también tiene competencias en enfermedades autoinmunes. Se han observado mutaciones en los genes de proteínas autofágicas como ATG5, ATG7 o ATG16L1 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (SLE)²³². También se ha visto que muchos pacientes de esclerosis múltiple poseen elevados niveles de

ATG5, parkina²³³ o ULK1²³⁴, así como bajos niveles de ATG16L2 (una isoforma de ATG16L1 que inhibe la formación del complejo ATG5-12-16).

También se ha visto asociación de defectos en la ruta autofágica con otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide^{235,236}, asma^{237,238} o diabetes tipo II²³⁹.

5.3. SÍNDROMES METABOLICOS

Se ha observado una relación entre autofagia y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD)²⁴⁰, donde la autofagia parece jugar un papel protector²⁴¹. También en cirrosis hepática y algunos síndromes metabólicos²⁴².

Los efectos anti-obesogénicos de la inhibición de la autofagia^{243,244,245} podrían deberse a un defecto en mitofagia ya que se ha visto gran acumulación de mitocondrias en el tejido adiposo blanco²⁴⁶. Se ha observado que deficiencias de ATG5 y ATG7 promueven la inhibición de la adipogénesis y promueven el "browning" del tejido adiposo blanco²⁴⁴. También se ha observado que una correcta mitofagia, promueve la transición de grasa beige a blanca por lo que la inhibición de esta ruta podría tener algún potencial terapéutico contra la obesidad o ciertos síndromes metabólicos²⁴⁷. Deleciones en la parkina, proteína relacionada con la mitofagia (véase apartado 3.1. *Mitofagia*) reduce la degradación mitocondrial por mitofagia, manteniendo los adipocitos beige²⁴⁸.

Otras mutaciones descritas impactan directamente en alguno de los pasos de formación del autofagosoma, como ocurre en la enfermedad de Nieman Pick, una enfermedad metabólica en la que el organismo no consigue metabolizar muchos tipos de lípidos. Se han descrito mutaciones en una proteína encargada del metabolismo de la esfingomiélin (esfingomiélin fosfodiesterasa 1 o *SMPD1*) cuyo fenotipo se caracteriza por acumulación de esfingomiélin y estructuras autofágicas elongadas incapaces de cerrarse, así como autofagosomas anormalmente grandes y con bajos niveles de ATG9²⁴⁹.

5.4. NEURODEGENERACIÓN

Al contrario que en el cáncer o en xenofagia, donde la autofagia puede jugar papeles opuestos, en términos de enfermedades neurodegenerativas la autofagia está ampliamente catalogada como un proceso protector. El dogma parece ser que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas son causadas por acumulación de agregados proteicos, los cuales deben ser eliminados por un tipo de autofagia selectiva que se ha discutido previamente (véase apartado 3.3. *Agrefagia*). Entre las enfermedades neurodegenerativas más estudiadas encontramos: i) el Parkinson cuyos agregados proteicos, compuestos casi en su totalidad por alfa-sinucleína, forman los llamados cuerpos de Lewy. Estos agregados son degradados por autofagia gracias al papel fundamental de la proteína adaptadora p62^{250,251} (véase apartado 3. *Autofagia selectiva*), ii) el Alzheimer, con unos depósitos de proteína β -amiloide²⁵² que parecen ser sensibles a la autofagia no canónica²⁵³ y depósitos de la proteína tau, los cuales podrían degradarse por autofagia mediada por chaperonas (CMA) o por macroautofagia²⁵⁴ y iii) la enfermedad de Huntington, la cual se caracteriza por tener agregados proteicos de una versión mutada de la proteína huntingtina, la cual sufre una expansión de glutaminas en su extremo amino terminal²⁵⁵ (cadena de poli-glutamina o polyQ), señal para que estos sean degradados por autofagia (véase apartado 3.3. *Agrefagia*).

Se han descrito diversas mutaciones tanto en proteínas autofágicas (ATGs)^{250,256} como en proteínas adaptadoras de ciertos tipos de autofagia selectiva. En este último caso, encontramos mutaciones en parkina²⁵⁷ y PINK²⁵⁸ que inhabilitan la degradación de mitocondrias dañadas (véase el apartado 3.1 *Mitofagia*), aumentando los niveles de ROS intracelular y promoviendo una forma temprana de la enfermedad de Parkinson²⁵⁹. También se ha observado que mutaciones en FAM134B (véase apartado 3.4. *Reticulofagia*) están relacionadas con diversas neuropatías²⁶⁰.

5.5. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

En los últimos años, son muchos los estudios que han caracterizado el papel de la autofagia como nodo fundamental en el desarrollo de enfermedades inflamatorias, como la enfermedad inflamatoria intestinal o IBD (*Inflammatory Bowel Disease*)^{200,261,262,263}. Esta categoría incluye dos enfermedades de origen principalmente idiopático que se caracterizan por una inflamación sostenida en el tiempo y que acaba cronificándose: la colitis ulcerosa (*UC* o *Ulcerative Cholitis*) y la enfermedad de Crohn (*CD* o *Crohn Disease*)²⁶⁴.

Nuestro laboratorio se ha centrado en investigar el papel que tiene el anteriormente citado alelo T300A de la proteína autofágica ATG16L1, el cual se ha postulado como uno de los alelos de riesgo principales para desarrollar enfermedad de Crohn²⁰⁰ (véase apartado 4. *Autofagia no canónica*).

A pesar de que uno de los factores más importantes para la aparición de esta enfermedad sea el componente genético, parece que es una enfermedad multifactorial en la que también intervienen otros elementos como cambios en la composición o disbiosis de la microbiota intestinal^{230,265} (que a su vez puede verse alterada por causas ambientales como el tipo de dieta²⁶⁶) o una respuesta inmune alterada ante microorganismos patógenos (véase apartado 5.2. *Respuesta inmune y adaptativa*).

Dentro del intestino se encuentran tres capas de protección ante microorganismos patógenos que son: i) una capa superficial de moco denso formada por glicoproteínas que contienen péptidos secuestradores y agregadores de bacterias. Esta capa separa pasiva y activamente la microbiota de la segunda capa²⁶⁷ ii) las propias células del epitelio intestinal dónde se encuentran enterocitos, células de Paneth o células de Goblet (productoras del moco previamente nombrado) entre otras²⁶⁸ iii) las células del sistema inmune de la submucosa como macrófagos, linfocitos o neutrófilos son las encargadas

de desencadenar la respuesta inmune mediante procesos como la presentación de antígenos o la secreción de interleuquinas pro- y anti-inflamatorias²⁶⁹.

En resumen, etiológicamente la enfermedad inflamatoria intestinal surge en un marco de susceptibilidad genética en la que un desbalance de la microbiota junto con una barrera intestinal debilitada permite la infiltración de ciertos microorganismos, generando una respuesta inmune e inflamatoria exacerbada²⁷⁰.

6. TRABAJO PREVIO DEL LABORATORIO

Anteriormente, el laboratorio identificó un motivo aminoacídico de unión al dominio WD de ATG16L1 a partir de una proteína transmembrana de tipo I llamada TMEM59. Ésta apareció originariamente en un screening de proteínas involucradas en muerte celular²⁷¹. Trabajos adicional previo revelaron una secuencia de 13 aminoácidos en la región intracelular o citosólica (residuos 260-281) encargada de la lipidación de LC3 a través de la unión al dominio WD del efector autofágico ATG16L1. Se generó una secuencia consenso en la que los residuos Y268, E272, Y277 y L280 (Figura 6a) eran críticos e indispensables para soportar la unión al dominio WD de ATG16L1 y por tanto la lipidación de LC3¹⁸⁶ (Figure 6b). Este motivo resultó ser demasiado degenerado para realizar comparaciones productivas con el banco de secuencias de proteínas, analizado con el algoritmo on-line ProSite Expasy. Por ello, se decidió refinar este motivo mediante la utilización de microarrays. Estos ensayos fueron realizados por el Dr Emilio Boada Romero y se basaron en mutar cada uno de los 13 aminoácidos formantes del potencial motivo (que a partir de ahora denominaremos péptido pro-autofágico) a todos los aminoácidos posibles, generando así un panorama mucho más complejo (véase *Figura 1b de la referencia 199*): mientras que determinadas posiciones (como la 270 o la 279) eran más permisivas (el residuo original se podía intercambiar por casi cualquier aminoácido), otras posiciones

(como la 268 y la 277) eran más restrictivas y el aminoácido original no permitía el cambio a otros aminoácidos²⁷². Además, se analizó la relevancia de otro parámetro: la flexibilidad de distancias. Se midió la capacidad de unión de este péptido a TMEM59 cambiando el número de aminoácidos originales existentes entre las cuatro posiciones críticas.

Tras todo este refinamiento, se llegó a un motivo (Figure 6c) más detallado que el inicial (Figure 6b). Este motivo fue utilizado en comparaciones bioinformáticas para encontrar proteínas que contuviesen alguna versión de esta secuencia refinada. Esta búsqueda realizada a través del algoritmo online ProSite ExPasy, enfrentó el motivo refinado frente a un banco de secuencias de moléculas transmembrana de tipo I (cuyo N-terminal se encuentra en la región extracelular y el C-terminal se encuentra en el citoplasma) con el fin de mantener la similitud estructural con TMEM59, la proteína donde encontramos el motivo original.

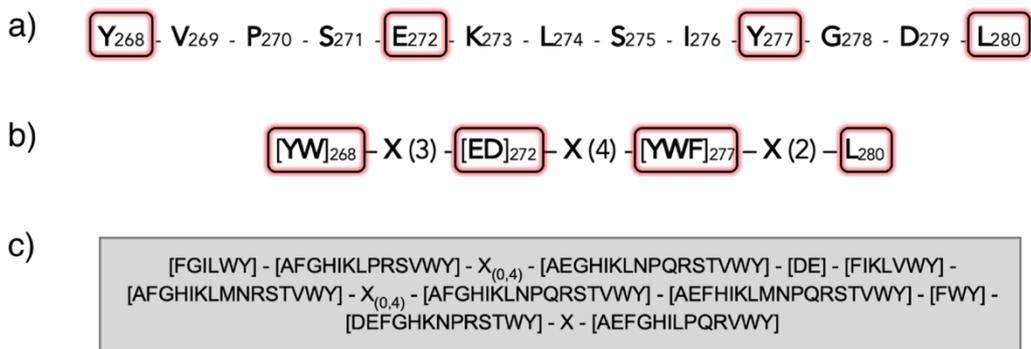


Figure 6. Secuencias de aminoácidos de TMEM59. a) Secuencia del dominio intracelular de TMEM59 (residuos 268-280) encargado de interactuar con ATG16L1 y por tanto de lipidar LC3. Rodeados en rojo se encuentran los cuatro aminoácidos mínimos que se necesitan para soportar esta actividad previamente descrita. b) Tras el refinamiento del motivo pro-autofágico añadiendo posibles residuos intercambiables y flexibilidad de distancias, obtenemos esta secuencia que fue la utilizada para iniciar el escáner de posibles proteínas transmembrana de tipo I contenedoras de este motivo.

TMEM59 participa en procesos de autofagia no canónica, ya que mediante esta unión a ATG16L1 es capaz de decorar con LC3 los propios compartimentos de membrana sencilla donde se encuentra. Además, su sobreexpresión y su depleción no parecen impactar demasiado en sustratos clásicos de autofagia canónica como p62 o LC3¹⁸⁶. A pesar de que el motivo de unión está bastante caracterizado^{186,201}, no está muy clara la función de TMEM59. No obstante, existe algún estudio que postula que TMEM59 podría ser un regulador positivo de la vía de señalización de Wnt y la catenina β . En estos estudios se ha observado que la región transmembrana de TMEM59 interacciona con proteínas de esta cascada señalizadora como FZD (Frizzled) o lipoproteína de baja densidad 6 (LRP6) formando macrocomplejos llamados señalosomas (signalosomes) que potencian la señalización²⁷³. También se ha visto que inhibe la glicosilación y por tanto la maduración del precursor de la proteína amiloide (APP) en su paso por el aparato de Golgi, así como la formación de la proteína amiloide β al interferir con las proteasas encargadas de esto (α -secretasa y β -secretasa)²⁷⁴.

En el screening inicial donde se usó el motivo “pro-autofágico” encontrado en TMEM59 como patrón para identificar más moléculas que contuviesen este potencial motivo, se identificaron diversos receptores de interleuquinas (IL-xRs), sugiriendo que éstos podrían ser posibles interactores del dominio WD40 de ATG16L1 ya que todos contenían alguna versión del motivo en su dominio intracelular²⁷². Las interleuquinas son pequeños péptidos secretados tras la activación de ciertas células inmunes y están involucradas en la regulación tanto de la respuesta inmune e inflamatoria como en el control de la activación, diferenciación, maduración, proliferación, migración y adhesión de diversos tipos de células del sistema inmune. Actualmente se conocen 40 interleuquinas diferentes (siendo la última la IL-40 en 2017²⁷⁵), y muchas de éstas necesitan uno o más co-receptores para señalizar (dímeros o trímeros), se ha observado que no existen tantos receptores como interleuquinas hay, y esto es debido a que

muchos receptores funcionan también como co-receptores, señalizando para más de una citoquina como ocurre con el receptor gamma de la interleuquina 2 (IL-2R γ) a través del cual señalizan las interleuquinas 2, 4, 9 o 21 entre otras²⁷⁶. Este también es el caso de las interleuquinas 18 (IL-18) y 37 (IL-37), donde encontramos 2 co-receptores el IL-18R1 y el IL-18RAP. Mientras que la IL-18 señala a partir de un homodímero (IL-18R1/IL-18R1), la IL-37 lo hará a partir de un heterodímero (IL-18R1/IL-18RaP)²⁷⁷. Los receptores de interleuquinas se han clasificado en la literatura de diversas maneras, aunque la más utilizada podría ser atendiendo a su estructura²⁷⁸. En la tabla 2 (véase *Resultados Capítulo 1 apartado 1. Selección de moléculas candidatas: Los receptores de interleuquinas*) se presentan todos los receptores utilizados en esta tesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1. LINEAS CELULARES

Las líneas que se han utilizado en esta tesis doctoral son las siguientes:

- 1) Las HEK-293T son una variante de las células embrionarias de riñón humano (HEK-293) que se han transformado con el antígeno T del virus SV40. Estas células fueron utilizadas en casi todos los experimentos de co-inmunoprecipitación de esta tesis. Fueron adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection).
- 2) HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano) fueron adquiridas en la ATCC (American Type Culture Collection).
- 3) La estirpe HEK-293T-AU:BCL-xL-CrmA-p35 fue una modificación creada en el laboratorio por la Dr. Martina Klee. En esta línea celular se generaron los virus que se utilizaron para transducir retroviralmente o lentiviralmente. Son unas HEK-293T que expresan de manera estable (véase apartado 2.1. *Transducción mediante vía retroviral*) inhibidores apoptóticos (p35, CrmA y BCL-xL), lo que les confiere una mayor resistencia a la toxicidad producida por la generación de los virus.
- 4) Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) provenientes de ratones WT o deficientes en TMEM59 generados por la Dra. Inmaculada Serramito Gómez utilizando la técnica de CRISPR/Cas9. Se generaron dos estirpes diferentes: una que produjo el "knock-out" de TMEM59 mediante una deleción de 8 nucleótidos (denominada en este trabajo como estirpe MEFs -8) y otra a partir de una inserción de 8 nucleótidos (denominada en este trabajo como estirpe MEFs +8).
- 5) Células de carcinoma colorrectal humano HCT116 deficientes en ATG16L1 (nombradas en este trabajo como HCTs ATG16L1 -/-) procedían del laboratorio del Dr. David Boone (Universidad de Chicago, Illinois, USA).

1.2. CONDICIONES DE CULTIVO

Todas las estirpes celulares fueron cultivadas con DMEM Gibco-Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, Gibco-Invitrogen). Este suero fue previamente inactivado (56°C durante 30 minutos). Al medio también se le añadieron 2 mM de L-glutamina (Gibco-Invitrogen) y antibióticos: 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Invitrogen).

Para los ensayos de infecciones bacterianas, las células fueron sembradas con DMEM con suero y glutamina, pero sin antibiótico. Esta condición se mantuvo así durante todo el transcurso del experimento (véase apartado 9. *Infección de células de mamífero con S. pyogenes*).

Todas las estirpes celulares se mantuvieron a 37°C y 5% CO₂ en una atmósfera húmeda en un incubador Steri-cycle CO₂ (Thermo Fischer Scientific).

1.3. MANTENIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO

Todas las líneas celulares se diluyeron y transfirieron a placas de cultivo cada 2 o 3 días. Tras aspirar el medio de cultivo, se realizó un lavado con 5 ml de PBS-1X Na⁺/K⁺ (8.5 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ y 137 mM NaCl en agua MiliQ, generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) para la eliminación de FBS remanente. Después se añadió una solución de 0.25% tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen) durante 5 minutos a 37°C. Para neutralizar el efecto de la tripsina, se añadieron entre 5 y 7 ml de DMEM completo, seguido de un pipeteo repetido en la propia placa con el fin de disgregar los agregados celulares. Se transfirió esta mezcla a un tubo cónico de 15 ml (Falcon) para someterlo durante 5 minutos a 500 rcf de centrifugación. Al pellet celular resultante se le sustituyó el medio antiguo por DMEM completo fresco.

La cantidad añadida dependió de la dilución requerida hasta el siguiente pase de mantenimiento y esta, a su vez, del estado del cultivo. Normalmente,

las células HeLa se diluyeron 1:4 para pases de 2 días y 1:8 para pases de 3 días, las HEK-293T y sus derivadas, así como las HCTs116 se diluyeron 1:5 para pases de 2 días y 1:10 para pases de 3 días. Por último, los MEFs se diluyeron 1:10 para pases de 2 días y 1:20 para pases de 3 días.

1.4. SIEMBRA DE CÉLULAS EN PLACA

Una vez despegadas las células por la acción de la tripsina y la neutralización de esta, se contó el número de células presentes en el cultivo con el fin de calcular las densidades y los formatos necesarios para cada uno de los diferentes experimentos. A un eppendorf de 1,5 ml se apartó alrededor de medio mililitro de la solución neutralizada. Para poder discriminar entre células vivas y muertas se utilizó el colorante vital azul de tripán (Sigma-Aldrich), el cual se mezcló en dilución 1:1 con la solución que previamente se apartó en el eppendorf. Se cargó esta solución en una cámara de conteo o cámara de Neubauer. Al número obtenido se le aplicó el factor de corrección de la cámara (10^4), el factor de dilución del azul de tripán y el número de cuadrantes contados. Los formatos utilizados en esta tesis fueron: placas multipocillo p24 (1,9 cm²), multipocillo p6 (9,5 cm²) y placas de 60 mm o p60 (21 cm²).

1.5. CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE CÉLULAS

Con el fin de mantener stocks de todas las líneas celulares que se generaron, estas se almacenaron a -180°C en tanques de nitrógeno líquido de las instalaciones de Crioconservación del Centro de Investigación del Cáncer. Para este proceso, se utilizó DMSO (Sigma-Aldrich) como agente crioprotector. Este se añadió al 10% (v/v) a FBS (en el caso de los MEFs) o a DMEM completo para generar el medio de congelación. Después de centrifugar el medio neutralizado al realizar el mantenimiento, el pellet de células fue resuspendido en el medio de congelación. Esta mezcla fue transferida a criotubos (CryoKING-Biologix) con

cierre de rosca para permitir la esterilidad del contenido. El paso de congelación fue gradual: los criotubos se mantuvieron unos minutos a 4°, posteriormente se transfirieron durante una o dos semanas a -80°C para su posterior almacenaje de largo recorrido a 180°C.

Por el contrario, el proceso de descongelación es rápido debido a la toxicidad celular del DMSO a temperatura ambiente. Los criotubos se dispusieron en un baño a 37°C y se transfirió su contenido a tubos cónicos de 15 ml (Falcon). Tras esto, se añadieron unos 10 ml de DMEM fresco completo gota a gota (con el fin de no producir un shock osmótico en las células recién descongeladas). Después se sometieron a una centrifugación de 500 rcf durante 5 minutos. El volumen celular se dispuso en una o dos placas de 10 cm² dependiendo de la línea celular y se completó hasta los 10 ml de DMEM fresco.

2. LINEAS CELULARES TRANSDUCIDAS

2.1. TRANSDUCCIÓN MEDIANTE RETROVIRUS

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para expresar transgenes de manera estable. Consiste en la generación de virus contenedores de un transgén a partir de unas células productoras. El sobrenadante de estas células con las partículas víricas es el que se utilizó para infectar las células diana.

Los vectores contenedores del transgén de interés que se utilizaron son los p12-MMP. Este vector se produjo mediante la inserción del pMMP en el p12 que comúnmente se utiliza en el laboratorio (véase apartado 3.1. *Sistemas de expresión*). En estos plásmidos, el transgén se expresa usando directamente la LTR del virus como promotor. En paralelo con el transgén de interés en el vector p12-MMP, se transfectaron los plásmidos encargados de generar las partículas víricas (pMD-MLV-OGP y pMD-VSV-G) (véase apartado 3.1.2 *Sistema p12/MMP*).

Primero se realizó la transfección de las células productoras a un 75% de confluencia, previamente plaqueadas en placas multipocillo de 6. Las HEK-293T-AU:BCL-xL-CrmA-p35, debido a su mayor resistencia a la citotoxicidad fueron las utilizadas en el laboratorio. Entre 12-24 horas post-transfección se sustituyó el medio por DMEM fresco y se sembraron las células diana.

36-48 horas después de la transfección, el sobrenadante se sometió a dos procesos de "depuración" para evitar contaminaciones entre líneas celulares. Primero se sometió a una centrifugación de 10 minutos a 700 rcf para después filtrarlo con acetato de celulosa de 0,45 μ M. El sobrenadante resultante se diluyó con DMEM fresco a la dilución requerida. A esta mezcla diluida se le añadió un polímero catiónico, el polibreno (8 μ g/ml, Sigma-Aldrich) cuya función es facilitar la entrada de las partículas víricas a la célula.

Esta mezcla final se utilizó para infectar las células diana a una confluencia del 20-25%. Las células diana junto con el sobrenadante viral se sometieron a una centrifugación (centrífuga Eppendorf) de 2000 rpm durante 1 hora, sin freno en aceleración y deceleración. La gran eficiencia de esta técnica hace posible no utilizar antibióticos de resistencia. En los casos requeridos se utilizó puromicina (1 μ g/ml, Sigma-Aldrich).

2.2. TRANSDUCCIÓN MEDIANTE LENTIVIRUS

El proceso de transducción lentiviral se desarrolla igual que la transducción retroviral salvo una excepción: los plásmidos que generan las partículas víricas y el vector en el que se inserta el transgén. En este caso, los plásmidos pCMV-VSV-G y psPAX son los encargados de las actividades *gag* y *pol*. Por otro lado, el vector utilizado es el vector lentiviral lentiCRISPR-v2, que contiene tanto la guía que define el sitio de corte por Cas9 como la Cas9 (véase apartado 3.1.3. Sistema CRISPR/Cas9).

3. PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. SISTEMAS DE EXPRESIÓN

3.1.1. SISTEMA PEAK8 Y PEAK12

Estos plásmidos proceden del laboratorio del Dr. Brian Seed (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). Ambos plásmidos pueden considerarse iguales a pesar de que el p12 (7kb) es ligeramente mayor que p8 (6,1kb). Los insertos clonados funcionan bajo un fuerte promotor: el EF1- α , que es tejido-independiente. Esto hace fácil la expresión de cualquier inserto en cualquier tipo de célula. Además, contiene el origen de replicación del SV40 y por tanto replican grandes cantidades en células poseedoras del antígeno T de este virus, como son nuestras HEK-293T. Contiene genes de resistencia a puromicina (controlado por un promotor eucariota) y resistencia a ampicilina (controlado por un promotor bacteriano).

En este trabajo se ha utilizado la construcción p12-*poly* o p8-*poly* como control negativo o como vector vacío. Este vector no contiene ningún inserto codificante y por tanto funcionó como relleno en las transfecciones.

A continuación, se muestra una lista de los plásmidos usados en esta tesis doctoral:

- **Los receptores de interleuquinas taguados con HA, GST o FLAG:** Todos los receptores de interleuquinas (IL-1R1, IL-1RAP, IL-2RG, IL-4RA, IL-6R, IL-10RB, IL-12RB2, IL-17RD, IL-18RAP, IL-20R, IL-21RA, IL-31RA y IL-33R (IL-1RL1), así como sus respectivos mutantes fueron clonados a un vector fresco y secuenciado p12 mediante la digestión Hind III / Not I. El vector nuevo al que se clonaron llevaba ya asociados los diferentes tags o etiquetas (HA, GST o FLAG). El IL-18R1 fue la excepción y sus clonajes se realizaron Eco / Not I.
- **Deleciones C-terminales (p12-IL-18R1-HA, p12-IL-18RAP-HA, p12-IL-33R-HA):** El producto de PCR de cada una de las deleciones del IL-18R1 (p12-IL-18R1-HA) fue clonado a un vector fresco p12 con las enzimas Eco y Bsp HI.

Para las deleciones del IL-18RAP y del IL-33R el clonaje se realizó con las enzimas Hind III y Not I.

- Las construcciones de ATG16L1 (WDD, Δ WDD y ATG16L1-“full length”) etiquetadas con GST y HA (p12-HA-WDD, p12-HA- Δ WDD, p12-HA-ATG16L1 y p12-GST-WDD, p12-GST- Δ WDD, p12-GST-ATG16L1): Estas construcciones fueron generadas previamente en el laboratorio enmarcadas en otros proyectos ya pre-existentes.
- Los mutantes del WD (p8-HA-WD40-F467A, p8-HA-WD40-K490A y p8-HA-WD40-F467A + K490A): Se realizó mediante ligación a tres partes: esto es un vector y dos insertos. Por un lado, un vector p8-HA se digirió con Spe I y Not I. Por otro lado, el WD fue digerido en un sitio interno Bam HI, lo que produjo dos insertos: el primero digerido con Spe I y Bam HI vino de un vector p8-HA-WD secuenciado y validado, los segundos insertos fueron los diferentes productos de PCR del WDD mutado, los cuales fueron digeridos con Bam HI y Not I.
- Los mutantes del WD en ATG16L1 (p8-HA-ATG16L1-F467A, p8-HA-ATG16L1-K490A y p8-HA-ATG16L1-F467A+K490A): Estas construcciones se realizaron mediante triple ligación: un vector y dos insertos. Por un lado, un vector p8-HA se digirió con Pci I y Not I. Por otro lado, el ATG16L1 fue digerido en un sitio interno Bam HI, lo que produjo dos insertos: el primero digerido con Pci I y Bam HI vino de un vector p8-HA-ATG16L1 secuenciado y validado, los segundos insertos fueron los diferentes productos de PCR del ATG16L1 mutado, los cuales fueron digeridos con Bam HI y Not I.
- Los mutantes del WD en ATG16L1 (p8-GST-ATG16L1-F467A, p8-GST-ATG16L1-K490A y p8-GST-ATG16L1-F467A+K490A): En estas construcciones, se digirió con un sitio interno existente en ATG16L1, por lo que el inserto se limitó a las 0,8 kb que contenían las diferentes mutaciones. El vector que contenía el GST completo y gran parte de ATG16L1 (p8-GST-

ATG16L1) fue digerido con Kpn I y Not I. Los insertos contenedores de las diferentes mutaciones del WD (p8-HA-ATG16L1-F467A, p8-HA-ATG16L1-K490A y p8-HA-ATG16L1-F467A+K490A) fueron digeridos Kpn I y Not I.

- **Las construcciones de las subunidades de la v-ATPasa (V_{0c} y V_{1A}):** Estas construcciones fueron cedidas por el Dr. Feng Shao²¹². Se clonaron mediante una digestión con Pci I y Not I usando como vector un p12-HA-ATG16L1, generando así las construcciones p12-HA-ATP6-V_{0c} y p12-HA-ATP6-V_{1A}. Adicionalmente, dado que la construcción de la V_{0c} venía etiquetada con FLAG, se pasó a un vector p12 fresco secuenciado con el fin de tener cada subunidad etiquetada con un tag diferente.
- **p12-GFP-SopF:** Esta construcción se clonó mediante una digestión Pci I y Not I del vector (p8-GFP-LC3) y del inserto (M6P-Blast-GFP-SopF). Esta construcción fue cedida por el Dr. Félix Randow, LMB, Cambridge).
- **Las quimeras CD16:CD7 de TMEM59 (p12-CD16:CD7-GST, p12-CD16-TMEM59 TM-GST, p12-TMEM59 EXT-CD7-GST):** La construcción p12-16:7-GST fue generada a partir de un p12-CD16-CD7-STOP digerido con Mlu I y Not I para añadirle el GST. La construcción p12-CD16-TMEM59 TM-GST se realizó mediante triple ligación: un vector y dos insertos. Por un lado, un vector p12 digerido con Hind III y Not I. El primer inserto (p12-CD16-CD7-STOP) se digirió con Hind III y Bam HI para obtener el CD16. El segundo inserto (p12-TMEM59-GST) fue digerido con Bam HI y Not I para obtener TMEM59-GST. Por último, la tercera construcción también se realizó mediante triple ligación: un vector y dos insertos. Por un lado, un vector p12 digerido con Hind III y Not I. El primer inserto (p12-TMEM59-HA) se digirió con Hind III y Bam HI para obtener el dominio extracelular de TMEM59. El segundo inserto (p12-CD16:CD7-GST) fue la primera construcción generada de este bloque, la cual se digirió con Bam HI y Not I para poder obtener CD7-GST.

3.1.2. SISTEMA p12/MMP

Estos vectores fueron una modificación de los vectores p12, en los que se ha insertado el pMMP. El vector p12 es necesario para la propagación en bacterias y para la adquisición de resistencia a ampicilina (bajo el promotor procariota citado en el apartado anterior). El pMMP contiene los elementos necesarios para empaquetar los transgenes de interés en las partículas víricas.

Como se explicó previamente (véase 2.1. *Transducción mediante retrovirus*), el transgén utiliza las LTRs como promotor. Para formar las cápsides se necesitan también el pMD-MLV-OGP y el pMD-VSV-G. Mientras que el primero codifica la proteína *gag*, el segundo codifica para la retro-transcriptasa *pol*. Ambos dos, junto con el p12-MMP provienen del laboratorio del Dr. Richard C. Mulligan (Harvard Medical School, USA).

A continuación, se muestra una lista de los plásmidos usados en esta tesis doctoral:

- **MMP-p12-LAMP1-GFP:** El clonaje se realizó mediante la digestión tanto del vector (MMP-p12-GFP) como del inserto (eGFP-N1-LAMP1-GFP) con Hind III y Not I.
- **MMP-p12-TMEM59-WT/4M-mRFP-IRES-PURO:** Estas construcciones se realizaron mediante triple ligación: un vector y dos insertos. El vector MMP-p12-GFP-IRES PURO fue digerido Hind III y Bsp HI manteniendo la resistencia a puromicina. El primer inserto fue digerido (MMP-p12-TMEM59-WT/4M-mRFP) Hind III y Not I de donde se obtuvo TMEM59-WT/4M-mRFP. El segundo inserto MMP-p12-GFP-IRES PURO fue digerido con Bsp HI y Not I con el fin de obtener el IRES.
- **Los mutantes del WD en ATG16L1 (MMP-p12-HA-ATG16L1-F467A-IRES-PURO, MMP-p12-HA-ATG16L1-K490A-IRES-PURO y MMP-p12-HA-ATG16L1-F467A+K490A-IRES-PURO):** Estas construcciones se realizaron mediante triple ligación: un vector y dos insertos. El vector (MMP-p12-HA-

ATG16L1-IRES-PURO) fue digerido con las enzimas AgeI y Not I, manteniendo el IRES-PURO. El primer inserto (MMP-p12-HA-ATG16L1-IRES-PURO) fue digerido con AgeI y Pci I de donde se obtuvo el tag HA. Los segundos insertos (p8-HA-ATG16L1-F467A, p8-HA-ATG16L1-K490A y p8-HA-ATG16L1-F467A+K490A) generados previamente (véase apartado 3.1.1. Sistema PEAK8 Y PEAK12) fueron digeridos con Pci I y Not I de donde se obtuvo la secuencia completa de los distintos mutantes de ATG16L1.

3.1.3. SISTEMA CRISPR/Cas9

El vector empleado fue el lentiCRISPR-v2 que contiene tanto la resistencia a puromicina (bajo un promotor eucariota) como la secuencia diana donde ha de cortar la Cas9. Esto permite prescindir de otro vector para la Cas9, ya que esta se encuentra también insertada en los vectores previamente descritos.

En este caso, para formar los lentivirus se necesitan otros dos plásmidos: uno que codifica para la *gag* (pCMV-VSV-G) y otro para la actividad retro-transcriptasa y otras proteínas estructurales necesarias (psPAX). A continuación, se muestra una lista de los plásmidos usados en esta tesis doctoral:

- **CRISPR de ATG16L1 (lentiCRISPR-v2 ATG16 humano):** Este plásmido fue previamente generado en el laboratorio en el marco de otros proyectos pre-existentes.

3.1.4. ETIQUETAS O TAGs UTILIZADAS

Para marcar las proteínas se utilizaron dos tipos de tags: los proteicos y los peptídicos. Los tags proteicos usados en esta tesis son GFP y GST. Ambos provienen de microorganismos (*Aequorea victoria* y *Schistosoma japonicum* respectivamente).

Por otro lado, los tags peptídicos son pequeños péptidos derivados de proteínas víricas u originados artificialmente. En este estudio se utilizaron el HA1 y el AU1 con origen vírico y el FLAG con origen artificial.

3.2. AMPLIFICACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCRs

3.2.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para diseñar los oligonucleótidos se tuvo en cuenta que estos debían contener secuencias reconocibles por enzimas de restricción en el extremo 5' con el fin de poder posteriormente subclonar el producto de PCR en los vectores de expresión necesarios. Además, se añadieron unas secuencias espaciadoras (gggcc) para facilitar el corte de estas enzimas, ya que la eficiencia de corte de estas en los extremos del ADN es más baja. También se tuvo en cuenta que al menos 25 nucleótidos tendrían que hibridar, siendo estos, alrededor de un 50% de guaninas y/o citosinas (Gs y Cs).

Todos los oligonucleótidos fueron expedidos por Thermo Fischer Scientific o Sigma-Aldrich y se recibieron de forma liofilizada. Se resuspendieron en TE-1X (Tris-EDTA solución 1x, pH 8.0; generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) hasta conseguir una concentración de 1 µg/ml. Todos ellos figuran en el *Anexo I: Oligonucleótidos para PCR*.

3.2.2. CONDICIONES DE PCR

Habitualmente, cada PCR se realizó en dos condiciones: ausencia y presencia de DMSO (-/+DMSO). Este ayuda a generar una hebra molde más laxa, sin estructuras demasiado complejas para que la enzima encargada de amplificar pueda leer bien la secuencia nucleotídica. Todos los reactivos detallados a continuación se adquirieron en Promega. En tubos de PCR de tapa plana se generó una mezcla de PCR que contenía 0,5 µg del ADN que funcionó

como molde de la reacción, 50 pmoles de los oligonucleótidos forward y reverse, 10 nmoles de un cóctel de dNTPs (Thermo Fischer Scientific) y 1.5 U de Pfu, así como el buffer de esta enzima (Pfu buffer) a concentración 1X (v/v).

Tras un suave pipeteo y un spin para homogeneizar esta mezcla, se transfirieron todos los tubos a un termociclador iCycler (BioRad) con las siguientes condiciones:

- I. Un ciclo de desnaturalización: 4 minutos a 96°C.
- II. Número variable de ciclos de amplificación (12-14 ciclos):
 - 1 minuto a 95°C (desnaturalización).
 - 1 minuto a 56°C (anillamiento).
 - 2 minutos a 72°C (extensión).
- III. Un ciclo de extensión final: 10 minutos a 72°C.
- IV. Un ciclo de mantenimiento: tiempo infinito a 4°C.

3.2.3. PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO DE PCR

Una vez terminado el proceso, se separaron 10 µl para correrlos en un gel de agarosa, con el fin de comprobar la amplificación de nuestra construcción. A estos 10 µl se añadieron 1.5 µl de buffer de carga Orange G (Sigma-Aldrich). La agarosa (Pronadisa) se preparó al 1% (m/v) en TAE 1x (tampón tris acetato-EDTA: 40 mM Tris, 1 mM EDTA en agua MiliQ, generado como solución TAE-50X por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer). Para ello se disolvieron 20 ml del reactivo TAE-50X en 980 ml de H₂O MiliQ. A esta mezcla se le añadió bromuro de etidio a 50 µg/ml (Sigma-Aldrich).

El buffer que se utilizó para correr este tipo de geles fue el propio TAE-1X sin bromuro de etidio.

Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) y las bandas se observaron en el transiluminador GelDoc2000 (BioRad) presente en el Centro de Investigación del Cáncer.

Los 40 μ l restantes se procesaron con el kit de purificación QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras eluir en 31 μ l de TE-1X, se sometieron 13,5 μ l a la digestión con enzimas de restricción (véase apartado 3.4. *Digestión con enzimas de restricción*).

3.3. MUTACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCRs MUTAGÉNICAS (MUTAGENESIS DIRIGIDA)

Este protocolo de mutagénesis dirigida fue utilizado para generar mutantes puntuales en determinados plásmidos de interés. Los reactivos utilizados (Agilent) son similares a los de una PCR convencional. Una de las diferencias es la enzima. La enzima utilizada en este protocolo es la versión Turbo de la Pfu (*Pfu Turbo*), la cual es altamente procesiva y puede procesar todo el plásmido entero. El resto de la reacción se mantuvo igual: se realizaron dos condiciones (-/+DMSO) en H₂O MiliQ a las que se incorporaron 50 ng del ADN molde (10 veces menos que en las PCRs convencionales), 5 pmoles de los oligonucleótidos forward y reverse (también 10 veces menos que en las PCRs convencionales), 10 nmoles del cóctel de dNTPs (Thermo Fischer Scientific) y 2.5 U de Pfu Turbo, así como el buffer de esta enzima (Pfu Turbo buffer) a concentración 1x (v/v).

3.3.1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Al diseñar estos oligonucleótidos se hizo un cambio de ciertos codones para que el producto amplificado contuviese la mutación deseada. La longitud debe de ser de unos 30 pares de bases, dejando siempre los codones mutados en el centro de este. A la hora de cambiar de codón, se intentó cambiar el mínimo número de bases posible. También se intentó elegir un codón que tuviese la

misma frecuencia de aparición en la naturaleza de la especie en concreto (ya que el codón más frecuente para alanina en humano puede no ser el más frecuente en ratón y por tanto causar alteraciones de los niveles de expresión posteriores).

3.3.2. CONDICIONES DE PCR

Al igual que las PCRs convencionales, esta reacción se realizó en un termociclador iCycler (BioRad). A pesar de que los pasos son esencialmente los mismos (desnaturalización inicial seguido de ciclos de desnaturalización, anillamiento y elongación), los tiempos y temperaturas pueden variar según el tamaño de la construcción sujeta a mutagénesis.

A continuación, se muestra el programa utilizado para las PCRs mutagénicas.

- I. Un ciclo de desnaturalización: 30 segundos a 95°C.
- II. Número variable de ciclos de amplificación (entre 16 y 18):
 - 30 segundos a 95°C (desnaturalización).
 - 1 minuto a 55°C (anillamiento).
 - 6 minutos a 72°C (o 90 segundos por kilobase (extensión)).
- III. Un ciclo de mantenimiento: tiempo infinito a 4°C.

3.3.3. PROCESAMIENTO DEL PRODUCTO

Del producto final se utilizó una quinta parte para correr un gel de agarosa al 1% (véase apartado 3.7.2. *Digestión diagnóstica*) y confirmar la amplificación del vector mutado. El volumen restante se digirió durante dos horas a 37°C con 20 unidades de la enzima Dpn I. Esta enzima es capaz de digerir el ADN metilado y por tanto es la responsable de eliminar la hebra de ADN molde que no contiene la mutación. Tras esto, se aplicó el protocolo establecido para la generación de ADN plasmídico de mini

preparaciones (véase apartado 3.6. *Transformación de bacterias competentes*).

Una vez generadas las mini-preparaciones, éstas se sometieron a secuenciación con el fin de confirmar los mutantes generados, así como de analizar otras posibles mutaciones que la Pfu Turbo haya realizado (lo que fue motivo de descarte de esa colonia concreta). Además, antes de generar las mini- o maxi-preparaciones, se confirmó que la enzima Pfu Turbo no mutó ningún codón más dentro del vector, lo que podría afectar a la futura expresión de nuestro transgén. Para ello, se digirió el producto mutado y secuenciado mediante enzimas de restricción (véase apartado 3.4. *Digestión con enzimas de restricción*) para ligarlo posteriormente sobre un vector del mismo tipo que esté validado y secuenciado.

3.4. DIGESTION CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Tras purificar las bandas obtenidas de la PCR, se sometieron a una digestión con enzimas de digestión con el fin de obtener extremos potencialmente ligables en vectores de expresión (véase 3.1. *Sistemas de expresión*). A la mezcla final, además de la banda purificada, se añadió un buffer salino de restricción enzima-dependiente con una concentración final 1x (v/v). A esta mezcla también se le incorporaron las enzimas de restricción pertinentes en iguales cantidades sin superar el 10% del volumen final. Esto se debe a que el glicerol en el que vienen conservadas las enzimas puede inactivar la actividad enzimática. Tras un suave pipeteo y un spin para homogeneizar esta mezcla, las digestiones se llevaron a una estufa a 37°C (Mettler) al menos durante 2 horas, aunque de manera habitual la digestión se realizó durante toda la noche.

Una vez los plásmidos fueron digeridos, se bloqueó la capacidad de religación en aquellas digestiones de las que se obtendrán los vectores. Esto fue posible mediante la eliminación del grupo fosfato en el extremo 5' gracias a la

incorporación de 6 U de una fosfatasa denominada CIP (New England Biolabs). La CIP se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Al finalizar la incubación con CIP, se procesó todo en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1,2%. La agarosa utilizada es Nusieve® GTG® Agarosa (Lonza), cuyas propiedades hacen posible el uso de los fragmentos cortados de ésta, directamente en el proceso de ligación de fragmentos de ADN. Al tener bajo punto de fusión, esta agarosa es muy frágil y tarda en polimerizar, por lo que los geles se prepararon unos 40 minutos antes de comenzar a correr las muestras.

Para el procesado de muestras, se añadieron 1,5 µl del colorante Orange-G a cada digestión para que las muestras pudiesen seguirse durante el proceso.

Siempre que sea posible, al principio y al final del gel se cargaron unos 5 µl de marcador de peso molecular. Además, entre el vector y las muestras inserto, así como entre los diferentes insertos, se dejó un pocillo libre con el fin de evitar contaminaciones cruzadas de construcciones. En un transiluminador, se cortaron con un punzón los fragmentos relevantes y se transfirieron a un eppendorf para la posterior ligación.

3.5. LIGACION DE FRAGMENTOS DE ADN

Para la reacción de ligación se preparó un mezcla común. Este mix común contenía la enzima ligasa, T4 DNA ligasa buffer 1X (New England Biolabs) y 1 µg/µl de BSA (New England Biolabs), en un volumen final de 10 µl en agua MiliQ que se dispuso en el mismo número de tubos como ligaciones hubiese en un bloque a 37°C (Grant Boekel). Mientras tanto, las bandas cortadas de la agarosa NuSieve se dispusieron en un bloque a 65°C (Grant Boekel) con el fin de fundir la agarosa y que esta fuese pipeteable.

Para ligaciones sencillas (un vector y un inserto), a la mezcla a 37°C se añadieron 1,5 µl del vector y 2,2 µl del inserto. En el caso de ligaciones complejas (un vector y dos o más insertos), a la mezcla a 37°C se añadieron 1,5 µl del vector y 1,5 µl de cada inserto. Se puso un control por cada ligación: en el caso de ligaciones sencillas (un vector y un inserto) el control será el vector con CIP aislado. En el caso de ligaciones complejas (un vector y dos o más insertos) la ligación control será la formada por el vector con CIP junto con el inserto más pequeño. Después de un pequeño spin, se dejaron mínimo dos horas (para ligaciones sencillas) o toda la noche (para ligaciones complejas) a 16°C.

3.6. TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS COMPETENTES

Tanto el producto de ligación como otro ADN plasmídico susceptible de amplificación pueden ser sometidos a transformación de bacterias. La finalidad de este proceso fue generar unas bacterias resistentes a ampicilina que llevaran incorporado nuestro plásmido de interés mediante un shock térmico. Las bacterias utilizadas para este proceso fue la cepa DH5- α de *Escherichia coli*, las cuales fueron generadas por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Estas bacterias son capaces de formar hasta $5 \cdot 10^7$ colonias por µg de plásmido transformado. Además, carecen de los sistemas de recombinación típicos de bacterias, lo que permite que repliquen fielmente el plásmido incorporado. Dependiendo de la dificultad de la ligación o de la concentración del ADN plasmídico que se quiera amplificar, se utilizaron 50 µl de estas bacterias con 2,4 µl de la solución plasmídica (re-transformaciones de un ADN plasmídico ya generado o ligaciones fáciles) o 100 µl de estas bacterias con 4,5 µl de la solución plasmídica (ligaciones difíciles). Esta mezcla se incubó durante 30 minutos en hielo antes de darles un shock térmico en un baño a 42°C (Grant Boekel) durante 47 segundos. Tras esto permanecieron dos minutos a

4°C para luego sembrarlas en placas de 10 cm² de LB (Luria-Bertani) con 2% agar (m/v) y 100 µg/ml de ampicilina generadas por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

Durante los 30 minutos de incubación de las bacterias competentes con los plásmidos a incorporar, se añadió a las placas de LB-agar una fina capa de LB-agar sin antibiótico al 1,5% fundido. Esto permitió a las bacterias que habían incorporado el plásmido darles el suficiente tiempo para empezar a producir la β-lactamasa presente en los vectores. Esta enzima es capaz de romper el antibiótico y, por tanto, solo las bacterias que hayan incorporado el plásmido fueron capaces de formar colonias. Las placas se incubaron en una estufa a 37°C (Memmert) durante toda la noche.

3.7. GENERACIÓN DE DNA PLASMIDICO

Para poder obtener suficiente ADN plasmídico para luego poder transfectar las diferentes construcciones en los experimentos, se necesitó crecer las bacterias en grandes cantidades con previa comprobación que tanto el peso molecular como la secuencia de los insertos incorporados en los vectores transformados fuese el correcto.

3.7.1. MINIPREPRACIONES

Se procedió a inocular colonias en tubos de vidrio con 5 ml de LB líquido suplementado con 100 µg/ml de ampicilina (preparada en agua MiliQ y posteriormente filtrada, Sigma-Aldrich). Mientras que en re-transformaciones y digestiones sencillas se inocularon 4 colonias, para construcciones más complejas se inocularon hasta 8 colonias. Los tubos de vidrio estériles cuyo tapón permitía algo de aireación se incubaron durante toda la noche en agitación a 220 rpm a 37°C.

Al día siguiente (20-23 horas), se centrifugaron las colonias durante 7-8 minutos a 16.100 rcf para formar un pellet bacteriano y luego aspirar el sobrenadante. Este proceso se repitió hasta tres veces para conseguir un volumen bacteriano considerable. Estos pellets bacterianos fueron procesados con el kit QIAprep Spin Miniprep Kit® (Qiagen) siguiendo las instrucciones de fabricación. Tras obtener un eluido de ADN plasmídico con 30 µl de TE-1X, las muestras fueron medidas con el equipo NanoDrop2000® (Thermo-Fisher) que se encuentra en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer.

3.7.1. DIGESTION DIAGNÓSTICA

Se procedió a digerir la mini-preparación obtenida previamente con las mismas enzimas de restricción que se utilizaron a la hora de clonar el inserto en el vector. Esto garantizó que los sitios de corte se mantuvieron intactos tras la ligación sin alterar la secuencia o el orden de lectura. La digestión se realizó como se ha explicado previamente (véase apartado 3.4. *Digestión con enzimas de restricción*). Una vez digeridas las mini-preparaciones se procesaron en un gel de agarosa al 1% (véase apartado 3.2.3. *Procesamiento del producto de PCR*).

3.7.2. SECUENCIACIÓN

Se generará una mezcla de unos 300 ng de la muestra a secuenciar, junto con 25 nmoles de los oligonucleótidos necesarios para secuenciar la región problema, esta mezcla se completó hasta 10 µl con H₂O MiliQ. Tras un suave pipeteo y un pequeño spin, estas muestras fueron transferidas al servicio General de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, donde fueron procesadas por el equipo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Hitachi). El análisis posterior de homología de secuencias se realizó tanto con el

programa SnapGene Viewer (GSL Biotech, disponible en snapgene.com) como con la herramienta online BLASTn del NCBI.

3.7.3. MIDIPREPARACIONES Y MAXIPREPARACIONES

Una vez las mini-preparaciones fueron validadas por completo, se realizó el inóculo de medio mililitro de las mini-preparaciones en 100 ml (para midi-preparaciones o "*midipreps*") o en 400 ml (para maxi-preparaciones o "*maxipreps*") de LB líquido suplementado con 100 µg/ml de ampicilina. Se incubaron a 37°C en agitación a 220 rpm durante toda la noche.

Al día siguiente fueron procesadas con sus respectivos kits (ambos Qiagen) Qiagen Plasmid Midi Kit ® y Qiagen Plasmid Maxi Kit ®. Se eluyeron en 56 µl (en el caso de las *midipreps*) o en 360 µl (en el caso de las *maxipreps*) y se validaron al igual que se ha explicado anteriormente.

4. TRANSFECCIÓN DE CÉLULAS

Tanto los ensayos de sobreexpresión, como los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados en esta tesis doctoral partieron de una transfección basada en lípidos. En este caso, se usó el reactivo JetPEI (Polyplus). Este reactivo forma liposomas que engloban los vectores de ADN y penetran en la célula. Más tarde se incorporarán al núcleo y se traducirán los transgenes de interés. 24 horas antes de la transfección se sembraron las células en el formato adecuado para cada experimento. La densidad óptima para realizar la transfección es de un 75%. Unas dos horas antes de la transfección se substituyó el medio por DMEM fresco para ayudar al crecimiento activo celular, debido a que la transfección implica cierto grado de toxicidad.

El medio en el que se preparó el medio transfectante con JetPEI, al igual que el medio en el que se incorporaron los plásmidos a transfectar fue un medio 150 μ M de NaCl (generado a partir de H₂O libre de endotoxinas y NaCl 5M, ambos reactivos de Sigma-Aldrich).

Por un lado, se generó un tubo con la mezcla de los plásmidos a transfectar. Por otro lado, se generó otro tubo con el JetPEI. Este último se incorporó al primero con una ratio 1:1. Tras homogeneizarlo pipeteando suavemente, se dejó incubar durante 40 minutos. Después se incorporó a las células de cada pocillo gota a gota.

Las cantidades (μ g) de ADN transfectado dependieron del formato de la placa. Siempre se cumplió que la ratio JetPEI:ADN fue de 3:1. En los diferentes experimentos realizados en esta tesis las cantidades fueron las siguientes: en las placas multipocillo de 6 se transfectaron 5 μ g de ADN con 15 μ g de JetPEI en un volumen final de 250 μ l y en las p60 se transfectaron 10 μ g de ADN con 30 μ g de JetPEI en un volumen final de 500 μ l.

Se cambió el medio unas 18 horas después de la transfección con el fin de reducir la posible toxicidad generada por la transfección. La lisis se efectuó a las 36 horas post-infección coincidiendo con el pico de expresión de los diferentes plásmidos en el sistema de p8/p12.

5. LISIS CELULAR

En esta tesis se han usado dos métodos diferentes de lisis: la lisis en NP40 (Igepal, Sigma-Aldrich) y la lisis en SB2X (Sample Buffer 2x). La lisis en NP40 no rompe membranas celulares ni interacciones proteína-proteína, por lo que todos los experimentos de co-inmunoprecipitación se realizaron con este método.

Por otro lado, tanto las sobreexpresiones como los ensayos de LC3, así como para el resto de los experimentos cuya finalidad no fue estudiar la

interacción entre proteínas, se realizó la lisis en SB2X. Este detergente es más agresivo y rompe también las membranas nucleares.

La composición del SB2X es la siguiente:

- 100 mM Tris-HCl pH 6.8
- 4% de SDS (v/v)
- 20% de glicerol (v/v)
- Enrasado con agua MiliQ.

La composición del buffer preparado con NP40 es la siguiente:

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5
- 150 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 1% de NP40(v/v)
- Enrasado con agua MiliQ.

Ambos buffers de lisis fueron suplementados con los siguientes inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (10 µg/ml, Roche) y cóctel de inhibidores de proteasas PIC (1%, v/v, Sigma-Aldrich).

El proceso de lisis celular se realizó siempre en frío con el fin de evitar la degradación proteica. Mientras que las HEK-293T se despegaron de la placa mediante pipeteo repetido sobre esta, el resto de las células (MEFs y HCTs) se despegaron mediante el uso de un raspador o "*scraper*". Tras un lavado de la placa con PBS-1X Na⁺/K⁺, se transfirió todo a un tubo cónico de 15 ml (Falcon) previamente enterrado en hielo que se sometió a una centrifugación de 700 rcf durante 5 minutos a 4°C en una centrífuga Eppendorf. Se aspiró el sobrenadante, se volvieron a lavar con 1ml de PBS-1X Na⁺/K⁺ y se transfirieron a un eppendorf de 1,5 ml. Estos eppendorf se

volvieron a centrifugar en una microcentrífuga Eppendorf a 500 rcf durante 5 minutos a 4°C. Después de esta centrifugación se aspiró el sobrenadante y se añadió el correspondiente buffer de lisis al pellet celular

5.1. LISIS EN SB2X

El SB2X en contacto con las proteínas forma una solución viscosa difícil de disgregar por ello se utilizaron puntas amarillas cortadas que facilitasen su disgregación. Tras esto, se aplicó un vigoroso vórtex a máxima agitación y se incubaron en un bloque a 100°C (Grant Boekel) durante 15 minutos. Después se centrifugaron a 16.100 rcf durante 5 minutos y se transfirió cada muestra a un tubo nuevo con el fin de eliminar cualquier residuo que hubiese formado pellet en esta última centrifugación.

5.2. LISIS EN NP40

Tras añadir el buffer de lisis, se homogeneizó una primera vez con puntas amarillas sin cortar. Este proceso ha de ser rápido con el fin de que estén el menor tiempo posible fuera del hielo. Una vez homogeneizadas, se mantuvieron en hielo durante 30 minutos, ejerciendo un vórtex medio cada 5-7 minutos.

Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugaron en una centrifuga Eppendorf a 16.100 rcf durante 5 minutos a 4°C. Tras esto, se transfirieron a nuevos tubos (véase apartado 7. *Co-inmunoprecipitaciones*).

5.3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se utilizó el kit DC Protein Assay (BioRad) para la cuantificación de proteínas. Este determina la concentración total de estas mediante el método de Lowry, una técnica bioquímica que, por colorimetría, mide la reacción de residuos aromáticos presentes en las proteínas con una solución alcalina de tartrato de cobre y el reactivo de Folin.

El producto resultante es un color azulado cuya intensidad correlaciona con la cantidad de proteína presente en la muestra. La concentración total de proteína se extrapoló a partir de la realización de una curva patrón con BSA (Pierce), válida en el intervalo de concentraciones de 0 a 1.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, previa dilución de los extractos proteicos con diluciones 1:6 en agua MiliQ. Se realizaron cuadruplicados de cada muestra para minimizar errores experimentales. Todas las mediciones se realizaron en placas de 96 pocillos (Falcon), cuya detección se procesó en un espectrofotómetro Ultra Evolution (Tecan) ligado al software XFluor, a 690 nm.

6. WESTERN BLOT

6.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenido el resultado de la medición de proteínas, se calculó la cantidad de proteína necesaria para generar las muestras (la cantidad de microgramos que necesitaremos para cada muestra dependerá de los detalles experimentales de cada ensayo). Las muestras se prepararon con el buffer de carga RSB2X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (m/v), 10% de β -mercaptoetanol (v/v, Sigma-Aldrich), 0.2% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) y 20% de glicerol (v/v)) y se completó el volumen cuando fue necesario con buffer de lisis.

Las muestras preparadas se incubaron durante 10 minutos en un bloque a 100°C para después centrifugarlas a temperatura ambiente a 16.100 durante 5 minutos antes de cargarlas en los geles de acrilamida.

6.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (electroforesis SDS-PAGE). Los geles se generaron empleando una

mezcla comercial de 30% acrilamida/bisacrilamida (37:5:1 (2.7% de agente entrecruzador, BioRad) y dos soluciones Tris: una para el gel de resolución o Lower y otra para el gel de empaquetamiento o Upper. Ambas fueron generadas en el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

Los componentes del Lower-Tris fueron:

- 0.375 mM de Tris-HCl pH 8.8
- 3.5 mM SDS
- Agua MiliQ

Los componentes del Upper-Tris fueron:

- 0.125 mM de Tris-HCl pH 6.8
- 3.5 mM de SDS
- Agua MiliQ.

Primero se polimerizó el gel de resolución utilizando APS al 0.1% (m/v, Sigma-Aldrich) y TEMED al 0.1% (v/v, Sigma-Aldrich). El porcentaje de poliacrilamida del gel de resolución se seleccionó según las condiciones del experimento, así como del tamaño de las proteínas problema: En general, este osciló entre los experimentos desde un 7% hasta un 14%. Al añadir el gel de resolución, se recubrió con H₂O MiliQ para aislarlo del oxígeno y permitir la polimerización. Transcurridos 40 minutos, se polimerizó de igual manera el gel empaquetador, el cual se mantuvo en un porcentaje constante del 5% de poliacrilamida en todos los experimentos.

Una vez polimerizados los geles, se dispusieron en el sistema Mini-PROTEAN II (BioRad). Se cargaron los extractos proteicos previamente preparados, en paralelo con un marcador de peso molecular de proteínas

(Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad). La electroforesis se efectuó a 90 voltios en voltaje constante durante 2 horas. El buffer utilizado para rellenar la cubeta se generó con 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0.05% SDS (m/v) en agua MiliQ, generado en forma de solución stock 10X por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Se diluyeron 100 ml de este reactivo en 900 ml de agua MiliQ con el fin de obtener el buffer de correr o "*Running buffer*" a concentración 1X.

6.3. TRANSFERENCIA HÚMEDA

Los geles posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) usando el sistema Mini-Trans Blot® (BioRad). Los geles, una vez el frente había avanzado lo suficiente como para separar correctamente las proteínas, se lavaron en buffer de transferencia frío durante 20 minutos para eliminar el SDS remanente. Durante estos 20 minutos se procedió a la activación de la membrana:

- 5 minutos en metanol.
- 5 minutos lavada en agua MiliQ.
- 10 minutos en buffer de transferencia.

El buffer de transferencia fue generado como una solución stock 10x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer y contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol (v/v) en agua MiliQ. Se diluyeron 100 ml de este reactivo en 900 ml de agua MiliQ con el fin de obtener el buffer de transferencia o "*Transfer buffer*" a concentración 1X.

La transferencia se efectuó a voltaje constante (100 V) durante dos horas en una cámara fría con una temperatura de 4°C. Además, a la cubeta de

transferencia se le añadió un imán o mosca. El ambiente frío y la agitación favorecieron la disipación del calor generado, contraproducente en las transferencias.

6.4. BLOQUEO Y ANTICUERPOS

6.4.1. BLOQUEO

Una vez transferido el gel a la membrana, esta se colocó en cubetas con una disolución de leche (Nestlé) al 10% (m/v) en TBS-T. Este fue preparado a partir de TBS (5 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM NaCl y 2.5 mM KCl en agua MiliQ) y Tween20 0.05% (v/v, Sigma-Aldrich). El TBS fue preparado como solución stock 20X por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer). Las cubetas fueron sometidas a agitación constante durante 1 hora con el fin de bloquear sitios inespecíficos. Tras esto, fueron lavadas entre 3 y 5 veces durante 30-40 minutos con TBS-T frío también en agitación constante.

6.4.2. ANTICUERPOS PRIMARIOS

Una vez lavado el bloqueo, se cambiaron a una cubeta limpia con el fin de evitar al máximo posible la presencia de leche en los anticuerpos primarios. En las cubetas se dispusieron los anticuerpos primarios necesarios para el experimento. Estos fueron disueltos con la dilución pertinente en una solución que llevaba 2% BSA (Sigma-Aldrich) y 0.1% de azida sódica NaN_3 (m/v, Sigma-Aldrich), en TBS-T. Las cubetas fueron tapadas y llevadas a la cámara fría donde se mantuvieron en agitación constante (50 rpm) durante toda la noche. En algunos casos, se mantuvieron durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. En el *Anexo I: Anticuerpos primarios*, se organizan todos los que se han utilizado en esta tesis.

6.4.3. ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Una vez terminado el tiempo de incubación del anticuerpo primario, se recuperó éste en un tubo cónico de 50 ml (Falcon) para el almacenamiento de largo recorrido y futuros usos. Las membranas se lavaron 3 veces durante 30 minutos antes de añadir el anticuerpo secundario. Este fue preparado en una disolución de leche al 5% en TBS-T. En el *Anexo II: Anticuerpos secundarios*, se organizan todos los que se han utilizado en esta tesis.

6.5. REVELADO

El revelado de las membranas se realizó por métodos quimioluminiscentes, ya que los anticuerpos secundarios utilizados se encontraban conjugados con la peroxidasa HRP. Los reactivos empleados fueron tanto el ECL (GE Healthcare) como el ECL-Clarity (BioRad) en función de la señal esperada. En un primer momento, se visualizaron en una reveladora automática AGFA 1890 Classics E.O.S., mediante el uso de películas SuperRX (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm). Estas se escanearon a 600 dpi y se seleccionaron las bandas relevantes que se incluyeron en las figuras correspondientes. Más tarde se sustituyó la cámara oscura por el revelado electrónico que se realizó con un revelador Amersham (Amersham Imager 680). Los Western-Blot realizados en este trabajo son representativos de al menos tres repeticiones.

7. CO-INMUNOPRECIPITACIONES (coIPs)

7.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Se sembraron células HEK-293T ($1.2 \cdot 10^6$) o HCT116 ($1.5 \cdot 10^6$) (véase apartado 1.4. *Siembra de células en placa*). A las 24 horas se transfectaron con el lípido JetPEI y las construcciones correspondientes (véase apartado

4. *Transfección de células*). 36 horas post-transfección se pusieron las placas en hielo para proceder a su lisis con NP40 1% (véase apartado 5.2. *Lisis en NP40*). Para las co-inmunoprecipitaciones normalmente utilizamos 180 μ l de volumen de lisis por punto.

Una vez lisadas, se recogió el sobrenadante y se separó en dos tubos diferentes:

- 30 μ l en lo que se denominó lisado total (TL en las figuras en *Resultados*) que funcionó como control de transfección de los distintos plásmidos
- 150 μ l que se diluyeron con cuatro volúmenes de buffer sin detergente con el fin de bajar el porcentaje de este en el buffer de lisis del 1% al 0,2%.

7.2. PRE-LAVADO

Una vez las muestras están diluidas al 0,2% de NP40, estas se sometieron a una matriz de proteína G-sefarosa (GE Healthcare) durante 1 hora para poder eliminar interacciones inespecíficas que se pudiesen producir entre las proteínas y la matriz de sefarosa. Esta matriz fue previamente bloqueada el día anterior a la co-inmunoprecipitación con BSA al 2% en buffer de colP. Tanto el bloqueo de esta matriz como todos los pasos posteriores de lavado se realizaron con un "buffer de IP". Este buffer se realizó como un buffer de lisis con cinco veces menos detergente (0,2%).

7.3. CO-INMUNOPRECIPITACIÓN Y LAVADOS

Tras haberse lavado las muestras en la matriz de proteína G, se centrifugaron los eppendorf con el fin de formar un pellet con la matriz de proteína G, recuperando el sobrenadante y transfiriéndolo a otros eppendorf

que contenían una matriz de GSH. Esta matriz también fue bloqueada el día anterior con BSA al 2% en buffer de IP.

El tiempo que estuvo incubando la muestra en esta matriz de GSH varió entre 1 y 4 horas, siendo lo más habitual 1 hora. Esta matriz fusionada con GSH posee gran afinidad por el tag GST. Esto permitió una fuerte interacción con las proteínas que contuvieran GST (precipitación) así como todas las proteínas unidas a las contenedoras de GST (co-inmunoprecipitación). Tanto esta incubación con la matriz de GSH, como el pre-lavado (véase apartado 7.2. *Pre-lavado*) se realizaron en la cámara fría (4°C) en una noria (Stuart SB3 Rotator) con rotación constante a 20 rpm.

Una vez terminada la incubación con la matriz de GSH, se procedió a lavar las muestras. Este paso es bastante variable; ya que el número de lavados varía entre 2 y 5 veces; el tiempo de lavado varía entre 10, 20 segundos o 1 minuto; el buffer utilizado varía también (de manera habitual se ha utilizado el buffer de IP (NP40 al 0,2%) aunque algunas colPs en este trabajo se han realizado lavando con buffer de lisis (NP40 al 1%).

Tras lavar, se centrifugó la matriz por última vez y se aspiró el sobrenadante. Se añadieron 25 µl de RSB2X y se incubaron durante 10 minutos en un bloque a 100°C. Tras esto, se centrifugaron a 16.100 rcf durante 5 minutos y se cargó el sobrenadante en un gel de acrilamida (véase apartado 6. *Western-Blot*).

7.4. CO-INMUNOPRECIPITACIONES CON ANTICUERPO

Existe una alternativa metodológicamente casi idéntica: en lugar de capturar proteínas tagueadas con GST con una matriz de agarosa fusionada a GSH, se capturó la proteína utilizando un anticuerpo específico, cuyas cadenas pesadas y ligeras serán reconocidas por una matriz de agarosa con proteína G.

En esta variante, tras el pre-lavado, se incubaron las muestras durante 2-4 horas con el anticuerpo pertinente. Después, esta solución se someterá a una matriz de proteína G. Esta matriz de proteína G, reconocerá las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo y por tanto será capaces de unir fuertemente tanto el anticuerpo, como la proteína que reconoce, como los potenciales interactores de esa proteína.

A partir de aquí, se procedió igual que con el resto de protocolo de lavados y desnaturalización previamente citado. Los anticuerpos usados aparecen en el *Anexo II: Anticuerpos primarios*.

8. INMUNOFLUORESCENCIAS

Para los experimentos de inmunofluorescencia, se sembraron placas según se describió previamente (véase apartado 1.2. *Siembra de células en placa*). En el caso de las inmunofluorescencias destinadas a observar la co-localización de *S. pyogenes*, este protocolo se fusionó con el descrito en el apartado 9. *Infección de células de mamífero con S. pyogenes*. Por lo tanto, dichas inmunofluorescencias fueron sembradas en DMEM sin antibiótico.

8.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS

El proceso de siembra se desarrolló en placas de multipocillo de 24, donde se colocaron cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Thermo Scientific). El proceso de adhesión de las células al vidrio de los cubreobjetos se facilitó mediante la previa incubación de estos con 50 μ l de poli-L-lisina 0,01% (Sigma-Aldrich) durante 30 minutos. Esto ocurre gracias a que la membrana plasmática cargada negativamente interactúa con la poli-L-lisina, poliaminoácido cargado positivamente. Tras esta incubación, los cubres fueron lavados dos veces con PBS-1X Na⁺/K⁺ frío y una vez con H₂O MiliQ fría.

8.2. INMUNOFLUORESCENCIA

Una vez finalizado el experimento o tratamiento concreto, se aspiró el medio de los pocillos y se procedió a lavar dos veces con PBS-1X Na⁺/K⁺. Tras esto se produjo la fijación de las células con el fin de mantener más o menos intactas las estructuras subcelulares. Para esto se incubaron los cubres con paraformaldehído al 4% en PBS-1X Na⁺/K⁺ (m/v, Sigma-Aldrich) durante 12 minutos. El paraformaldehído o PFA es un polímero que funciona como agente fijador que además preserva las estructuras subcelulares. Posteriormente se lavó el PFA dos veces con PBS-1X Na⁺/K⁺ frío.

Dado que las células están transducidas con proteínas con etiquetas fluorescentes como GFP ("*green fluorescent protein*") o mRFP ("*monomeric red fluorescent protein*"), no fue necesario el uso de anticuerpos, por lo que tras lavar dos veces con PBS-1X Na⁺/K⁺ frío, se tiñó el núcleo mediante la incubación de una solución de DAPI 0,1 µg/ml (Sigma-Aldrich) en PBS-1X Na⁺/K⁺. Se repitió el proceso de lavado una última vez antes de montar los cubreobjetos sobre los portas. Este proceso de montaje se realizó colocando 4 µl de la resina PROLONG GOLD (Invitrogen) en portaobjetos (LineaLab) sobre los que se colocaron los cubreobjetos boca abajo.

Todo este proceso de principio a fin se realizó en atmósfera oscura y húmeda. Finalmente se sellaron con laca de uñas.

8.3. VISUALIZACIÓN POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Leica (Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer), utilizando los láseres de excitación 405 (azul), 488 (verde), 561 (rojo) y/o 633 (rojo lejano). Las ventanas de emisión se establecieron en valores suficientemente distantes para eliminar la posible existencia de superposiciones entre

canales. Las imágenes se visualizaron tanto con el objetivo 63x como con el objetivo 100x, ambos con el uso de aceite específico para microscopía.

Los análisis se realizaron con Fiji (Rasband W., National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), programa de acceso libre que se encuentra disponible en línea. Para el análisis de las co-localizaciones se empleó la extensión JaCOP perteneciente al software de ImageJ. Esta extensión, analiza la co-localización entre dos colores mediante el establecimiento de un umbral a partir del cual, calcula el coeficiente de Manders. Este valor varía entre 0 (no hay co-localización) y 1 (co-localización completa). Este coeficiente se calculó para estudiar cuanta señal del primer canal solapaba con el segundo y viceversa.

El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 10. *Análisis estadístico de los datos.*

9. INFECCIÓN DE CÉLULAS DE MAMÍFERO POR S. PYOGENES

Para los experimentos de infección se utilizó la bacteria *Streptococcus pyogenes*, así como su versión que expresa GFP. Ambas cepas presentan resistencia a espectinomicina y fueron donadas por Michael Wessels (Harvard).

Esta bacteria crece en el medio de cultivo Todd Hewitt Broth (THB, Condalab) por lo que se generaron tanto placas THB-agar al 2% como THB en formato líquido. Ambas fueron complementadas con un 0,2% de extracto de levadura (Condalab) con el fin de enriquecer el medio y facilitar el crecimiento de la bacteria. En los casos en los que estas placas fueron utilizadas con antibiótico, este se añadió a una concentración de 100 µg/ml.

El medio THB, en ambos casos fue preparado por el Servicio y Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Este fue preparado mediante la disolución de 30 gramos de este en agua MiliQ.

9.1. PREPARACIÓN DE CÉLULAS EUCARIOTAS

Justo 24 horas antes del experimento en cuestión, se sembraron las células relevantes en el formato de placa deseado: para los experimentos de citometría de flujo e inmunofluorescencias se emplearon placas de multipocillo de 24 (véase *apartados 8. Inmunofluorescencias y apartado 9.4. Medición de la infección bacteriana por citometría de flujo*). Todos los experimentos de infección bacteriana fueron realizados en MEFs. Estos fueron sembrados en DMEM completo sin antibióticos a una densidad de $1,4 \cdot 10^5$ para placa multipocillo de 6 o de $3,3 \cdot 10^4$ para placa de multipocillo de 24. Las células se incubaron como se describió previamente (véase *apartado 1.2. Condiciones de cultivo*)

Para asegurar la ausencia total de antibiótico en las células destinadas a los experimentos de infección, empleamos DMEM completo sin antibiótico desde el paso de la neutralización de la tripsina.

9.2. CRECIMIENTO BACTERIANO

Entre dos o tres días antes (nunca menos) se extiende la bacteria congelada en stocks con glicerol con asas de siembra en placas de THB-agar + espectinomicina 100 $\mu\text{g/ml}$. La placa se incubó durante al menos 48 horas en la estufa a 37°C (Memmert).

Para los experimentos de infección se usaron dos modalidades de crecimiento bacteriano: crecimiento en agitación ("*shaking*") o crecimiento en estático ("*static*").

Para el crecimiento en agitación: el día anterior por la tarde se inocularon las máximas colonias posibles en 5 ml del THB líquido en matraces de 25 ml con el fin de obtener cultivos saturados a la mañana siguiente. Estos matraces se incubaron en un baño de agua (Infors AG CH-4103 Bottmingen) con agitación constante 220 rpm a 37°C. Al día siguiente

se midió la densidad óptica a 600nm, la cual se encontraba en el entorno de 1,2. Se transfirió parte del cultivo con el fin de crecer un segundo maxi-cultivo en dilución 1:100. Este maxi-cultivo se incubó también en un baño de agua (Infors AG CH-4103 Bottmingen) con agitación constante 220 rpm a 37°C durante 7-8 horas hasta llegar a la densidad óptica requerida (0,85 OD₆₀₀).

Para el crecimiento en estático, el día anterior por la tarde se inocularon tubos cónicos de 15 ml (Falcon) con 14 ml de THB previamente caliente. Los tubos se sellaron con Parafilm y se incubaron inclinados toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente se invirtieron varias veces los tubos con el fin de homogeneizar el pellet bacteriano formado. Una vez hecho esto, se midió su densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀). Las colonias elegidas fueron aquellas que presentaron una densidad óptica de 0,85. En este caso no es necesario la realización de un cultivo intermedio. Con el fin de obtener una relación entre la densidad óptica a 600 nm y el número de bacterias, se realizó una titulación bacteriana en la que se calculó que en una densidad óptica de 0,85 hay $8 \cdot 10^8$ bacterias.

Una vez se alcanzó la densidad óptica deseada, se dispusieron varios eppendorf con 1 ml del medio con bacterias y se centrifugaron a 9000 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se lavó con 1 ml de PBS-1X Na⁺/K⁺. Se pipeteó suavemente para disgregar el pellet bacteriano en el PBS y se repitió el proceso con el fin de eliminar cualquier resto del THB. Tras esto, se añadió 1 ml de DMEM sin antibiótico.

9.3. INFECCIÓN CELULAR.

Se realizó el contaje de cada estirpe celular involucrada en el experimento en curso (véase apartado 1.4. *Siembra de células en placa*) con el fin de poder calcular correctamente la multiplicidad de infección (MOI, de sus siglas en inglés

"multiplicity of infection"). El valor de la MOI indica el número de bacterias que se infectaron por cada célula eucariota.

Se aplicó la siguiente fórmula con el fin de calcular el volumen necesario de bacterias requerido para cada experimento:

$$\left(\frac{(\text{número de puntos}+1) \cdot X \text{ (MOI)} \cdot Y \text{ (número de células por pocillo)}}{8 \cdot 10^8} \right) \cdot 1 \cdot 10^3$$

Tras generar el medio de infección, se eliminó el medio de los pocillos sujetos a infección. El tubo se invirtió cada 4-5 pocillos con el fin de infectar de manera homogénea todos los pocillos. Una vez repartido el medio infectivo, las placas multipocillo se sometieron a una centrifugación de 7 minutos a 500 rcf eliminando el freno de aceleración y deceleración con el fin de facilitar el proceso infectivo. Esta centrifugación se realizó en una centrífuga Eppendorf.

Después fueron incubadas durante 45 minutos en un incubador de células a 37°C con 5% de CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se realizarán dos lavados con DMEM sin antibiótico. Luego se incubaron durante 1 hora con DMEM sin antibiótico suplementado con gentamicina a una concentración de 100 µg/ml. Esta incubación mata todas las bacterias extracelulares que no hayan sido capaces de entrar en la célula.

Al final de esta incubación se le denominó tiempo 0 (t=0) para todos los experimentos desarrollados en esta tesis. En este punto, se procesaron las condiciones control (células no infectadas) y t=0.

En los siguientes puntos temporales, se volvió a lavar dos veces con DMEM sin antibiótico para eliminar el exceso de gentamicina. Cada tiempo concreto fue incubado con DMEM sin antibióticos suplementado con gentamicina a una concentración de 10 µg/ml. Esta incubación evita la reinfección entre las células, así como el traspaso de bacterias entre unas

células y otras. Los distintos puntos temporales fueron procesados dependiendo de la naturaleza del experimento en el momento oportuno.

9.4. MEDICIÓN DE LA INFECCIÓN BACTERIANA POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para los experimentos de citometría de flujo, las células fueron sembradas en placas multipocillo de 24. El procesamiento comenzó eliminando el medio a cada tiempo oportuno. Se realizó un lavado de PBS-1X Na⁺/K⁺ antes de añadir 250 µl de tripsina. Esta se incubó durante 5-7 minutos a 37°C. Esta tripsina se neutralizó con 800 µl de DMEM sin antibiótico y la mezcla se transfirió a un eppendorf de 1,5 ml. Se sometieron las muestras a una centrifugación a 1.500 rcf durante 5 minutos, tras la cual se añadieron 200 µl de PBS. Una vez homogeneizados los pellets en estos 200 µl, se añadieron otros 200 µl de PFA al 4% para fijar las células. Las muestras se incubaron durante 12 minutos en oscuridad. Se centrifugaron las muestras a 1.500 rcf durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en un volumen de PBS-1X Na⁺/K⁺ que dependió del volumen celular observado tras la centrifugación. Estas muestras se conservaron en la nevera a 4°C (no más de 24 horas).

El procesamiento se realizó con un citómetro Becton Dickinson. Las condiciones fueron ajustadas para que la velocidad de flujo fuese rápida. En cuanto al número de eventos, a pesar de que fue variando a lo largo de los experimentos, la mayoría fueron realizados a 20.000 eventos. Dado que los porcentajes de infección en MEFs eran bastante bajos, las muestras se pasaron en modalidad lineal, ya que se creyó más conveniente para poder ver cambios sutiles. El análisis posterior se realizó mediante el software FlowJo que se encontraba disponible y de distribución limitada. Se analizaron los siguientes parámetros: porcentaje de células vivas, porcentaje de células positivas y media

de fluorescencia de células vivas. Además, las células positivas se subdividieron a su vez en cuatro ventanas que recogían los diferentes grados de infección (low, médium, high y over 250) que fueron segregados a nuestra discreción. El análisis estadístico de los datos se realizó acorde a lo descrito en el apartado 10. *Análisis estadístico de los datos.*

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los análisis estadísticos se realizaron mediante el Software GraphPad Prism versión 8 para MacOS (GraphPad Software, La Jolla California, USA) de distribución limitada.

En las gráficas de box-plot, la línea central representa la mediana. La parte inferior de la caja simboliza el percentil 25 mientras que la parte superior el 75. Los bigotes señalan los valores mínimo y máximo.

Para las gráficas de cinéticas de infección, se representó la media de los triplicados de cada condición experimental, así como su desviación estándar.

El estadístico utilizado en todos los análisis fue el t-test de muestras pareadas. Dado que el nivel de significación se fijó en 5%, los valores de referencia son los siguientes: n.s. indica un $p\text{-valor} > 0,05$; * indica un $p\text{-valor} < 0,05$; ** indica un $p\text{-valor} < 0,01$; *** indica un $p\text{-valor} < 0,001$; **** indica un $p\text{-valor} < 0,0001$.

OBJETIVOS

1. Estudio de potenciales interactores específicos del dominio WD de ATG16L1 que contienen un motivo previamente identificado en TMEM59.
2. Estudio de las funciones autofágicas no canónicas de TMEM59 y caracterización del mecanismo por el cuál es capaz de lipidar LC3-II.
3. Análisis del posible papel de TMEM59 en xenofagia frente a la infección por *S. pyogenes*.

RESULTADOS

CAPITULO 1. ANÁLISIS DE
POTENCIALES INTERACTORES DEL
DOMINIO WD DE ATG16L1

1. SELECCIÓN DE MOLÉCULAS CANDIDATAS: LOS RECEPTORES DE INTERLEUQUINAS

Como se explicó previamente en la Introducción (véase 3. *Autofagia no canónica*), la obtención de la versión refinada del motivo de interacción con el dominio WD permitió realizar comparaciones bioinformáticas productivas contra el banco de secuencias de moléculas transmembrana. En estos ensayos se identificó una amplia colección de receptores de interleuquinas cuyo dominio intracelular presentaba alguna versión del motivo. Estas moléculas resultaron interesantes a la hora de intentar atribuir nuevas funciones al dominio WD. Este tipo de dominio es ampliamente conocido por su versatilidad, y es eje fundamental del trabajo del laboratorio.

A continuación, en la Tabla 2, se muestran todos los receptores identificados en estos ensayos junto con algunos datos relevantes sobre ellos: el nombre de cada uno de los receptores (primera columna) junto con la longitud de aminoácidos de la proteína completa, así como de su dominio intracelular (segunda columna). También aparecen las interleuquinas para las que señalizan (tercera columna), así como la posición del aminoácido inicial y final de los diferentes potenciales motivos que se han reconocido como similares al péptido pro-autofágico encontrado en TMEM59 (cuarta columna). Por último, se detalla la secuencia de todos los motivos encontrados en los microarrays (última columna).

El código de colores indica la familia a la que pertenece cada receptor según su estructura: receptores de citoquina de tipo I (azules), receptores de citoquina de tipo II (amarillos), receptores de la familia de la IL-1 (verdes) y receptores de la IL-17 (rojos) (Tabla 2).

NOMBRE DEL RECEPTOR	LONGITUD TOTAL Y ID	INTERLUQUINA QUE SEÑALIZAN	POSICION DEL MOTIVO	POTENCIAL MOTIVO
IL-1RAP	570 aa 181 aa	IL-1B, IL-33, IL-36	406-423 528-541 524-536 524-541	DIYVSYARNAEEEEFVLL GEKSKYPOGRFWKQ IKWKGEKSKYPOG IKWKGEKSKYPOGRFWKQ
IL-2RG	369 aa 85 aa	IL-2, IL-4, IL-7, IL-21	293-310 299-313 296-310	LKNLEDLVTEYHGNFSAW LVTEYHGNFSAWSGV LEDLVTEYHGNFSAW
IL-4RA	825 aa 568 aa	IL-4, IL-13	780-798 785-798 258-266 356-368 445-451	LAPSGISEKSKSS.SSFHPA ISEKSKSS.SSFHPA IKKEWWDQI ISVVRCELFEAP WDEFPSA
IL-6RB	918 aa 276 aa	IL-6, IL-11	638-655 708-717 711-717	LFCFNKRDLIKHIWPNV LKSLDLFKKE LDLDFKKE
IL-10RB	325 aa 82 aa	IL-10, IL-22, IL-26, IL-28, IL-29	283-295	FPLSDENDVFDKL
IL-12RB2	862 aa 218 aa	IL-12	705-721 707-721 763-770	LVISEVLHQVTPVFRHP ISEVLHQVTPVFRHP LVDLYKVL
IL-17RD	739 aa 418 aa	IL-17	552-570 718-732 552-563 574-585 391-397 579-585	FIDEEDWFEKQFVPFHPP GSCKADLGCRSYTDE FIDEEDWFEKQ YREPVEKFDSDG LDLWEDF LEKFDSDG
IL-18R1	541 aa 190 aa	IL-18, IL-37	350-362 498-511 350-361	IYRVDLVLYRHL LKWKADKSLSYNSR IYRVDLVLYRHL
IL-18RAP	599 aa 221 aa	IL-37	380-395 385-395 386-395	LLYRHWIEVLLYRTY WIEVLLYRTY IEVLLYRTY
IL-20RA	553 aa 281 aa	IL-19, IL-20, IL-24	388-406 296-303 399-406	LSRTIPDKTVIEYEDVR FDKRFFVP IEYEDVR
IL-21R	538 aa 284 aa	IL-21	453-468 456-468 298-309 267-279 301-309 314-320	LADGEDWAGGLPWGGR GEDWAGGLPWGGR GSSLELGPWSPE IWAVSPERFFMP LELGPWSPE LEVYSCH
IL-31RA	732 aa 191 aa	IL-31	554-571 605-615 612-623 616-623	WPTVPNPAESSIATWHGD IDKLVNFGNV FGNVLQEIFTDE LQEIFTDE
IL-33R (IL-1RL1)	556 aa 206 aa	IL-33	359-371 361-371	LLWRDIAPYKTR WRDIAPYKTR

Tabla 2. Lista de receptores de interleuquina obtenidos en los arrays. Se muestra en la tabla el nombre de cada uno de los receptores (primera columna) junto con la longitud de aminoácidos de la proteína completa, así como de su dominio intracelular (segunda columna). También aparecen las interleuquinas para las que señalizan (tercera columna), así como la posición del aminoácido inicial y final de los diferentes potenciales motivos que se han reconocido como similares al péptido pro-autofágico encontrado en TMEM59 (cuarta columna). Por último, se detalla la secuencia de todos los motivos encontrados en los arrays (última columna). En esta última, aparecen en negrita las secuencias de los receptores que posteriormente se someterán a mutaciones puntuales con el fin de inactivar el motivo (véase Tabla 3). El código de colores de la primera columna indica la familia a la que pertenece cada receptor según su estructura: receptores de citoquina de tipo I (azules), receptores de citoquina de tipo II (amarillos), receptores de la familia de la IL-1 (verdes) y receptores de la IL-17 (rojos).

Los receptores de interleuquinas son moléculas transmembrana que constan de tres partes: un dominio extracelular que se encarga de unir los diferentes ligandos, un dominio transmembrana y otro intracelular que se encarga de iniciar el proceso de señalización mediante la unión a diferentes proteínas como pueden ser Myd88 o las Jak.

Los receptores de tipo I (Figura 7a) son proteínas transmembrana de tipo I, es decir que tienen su N-terminal en la región extracelular y su C-terminal en el interior celular. Su parte extracelular está formada por dos módulos de fibronectina tipo III unidos por un conector ("*linker*"). Estos receptores se activan tras la unión del ligando a un monómero para después homodimerizarse. Este proceso de dimerización se ve fortalecido a través de los dos módulos de fibronectina previamente citados. Por un lado, gracias a unos puentes disulfuro formados a partir de cuatro cisteínas en el módulo más N-terminal. Por otro lado, a partir del motivo WSXWS que se encuentra en el otro módulo, en posición más C-terminal²⁷⁹.

Los receptores de tipo II (Figura 7b) forman una familia de 10 miembros con dominio transmembrana y 2 miembros solubles. Todos forman heterodímeros o multímeros y normalmente una de las cadenas es larga y otra corta. Por ejemplo, el IL-10RB (receptor pequeño) se puede asociar a otros más grandes como el IL-10RA, el IL-22R (o su versión soluble, la IL-22BP) o el IL-28R²⁸⁰. La principal diferencia con los de tipo I es que a pesar de poseer también los dos módulos de fibronectina y poseer las cuatro cisteínas, los de tipo II carecen del motivo WSXWS presente en el segundo módulo de los receptores de tipo I.

Por último, los receptores de la familia de la IL-1 (Figura 7c). En cuanto a su región extracelular está formada por dominios similares a IgG cuya longitud es variable. Al igual que la IgG, mantiene puentes disulfuro en su estructura. La región intracelular de estos receptores posee un dominio altamente conservado de unos 100-200 aminoácidos llamado dominio TIR. Este dominio se ha observado en receptores de tipo Toll (TLRs), receptores de la familia de la IL-1 y también en proteínas adaptadoras como la proteína de respuesta primaria a la diferenciación mieloide (*Myd88*), proteína adaptadora que contiene dominio TIR inductora de interferón β (*TRIF*), proteína adaptadora relacionada con TRIF (*TRAM* o *TICAM1*), proteína adaptadora que contiene dominio TIR (*TIR adaptor protein* o *TIRAP*) y la proteína que contiene el motivo estéril y el motivo armadillo (*SARM*). Estos dominios TIR se han visto involucrados en interacciones proteína-proteína de dos tipos: i) homotípicas entre diferentes TIR, formando complejos de proteínas con dominios TIR²⁸¹ como por ejemplo los formados entre receptores de interleuquinas de la familia de la IL-1 y moléculas adaptadoras encargadas de iniciar la señalización como las citadas previamente o ii) heterotípicas con otras moléculas carentes de estos dominios. Se conoce además que en estos dominios TIR existen tres regiones o "boxes"

altamente conservadas que parecen estar implicadas en procesos de señalización,^{282,283} interacciones homotípicas²⁸⁴ o inmunidad^{285,286}.

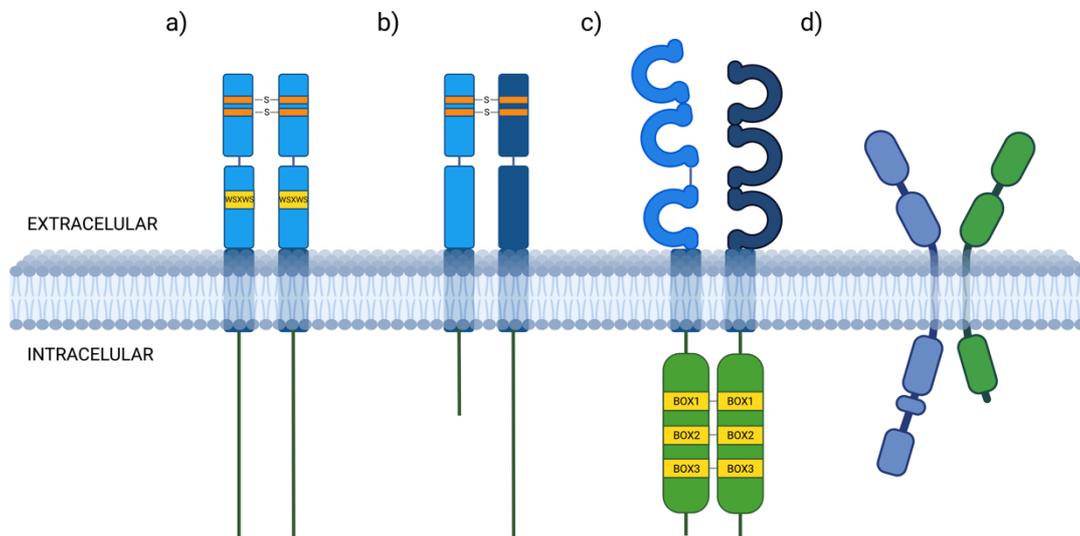


Figura 7. Tipos de receptores de interleuquinas encontrados. **a)** Receptores de citoquinas de tipo I entre los que encontramos el IL-2RG, el IL-4RA, el IL-6RB, el IL-12RB2 y el IL-31RA. Contienen dos módulos de fibronectina III con dos cisteínas que generan puentes disulfuro necesarios para la homodimerización. **b)** Receptores de citoquinas de tipo II. Aquí se encuentran el IL-10RB y el IL-20RA. Normalmente forman heterodímeros o multímeros y siempre hay un monómero corto (ej. IL-10RB) y un monómero largo (ej. IL-10RA). Este tipo de receptores se diferencian de los de tipo I (**a**) en que carecen del motivo WSXWS presente en uno de los módulos de fibronectina. **c)** Receptores de la familia de la IL-1 entre los que están el IL-1RAP, el IL-18R1, el IL-18RAP y el IL-1RL1 (que en esta tesis está nombrado como IL-33R). Su dominio extracelular está compuesto por cadenas similares a la IgG con puentes disulfuro estabilizantes. Su región intracelular está mayoritariamente compuesta por el dominio TIR, una zona con tres “boxes” altamente conservadas. **d)** Receptores de la IL-17.

2. VALIDACIÓN DEL MOTIVO DE INTERACCIÓN AL DOMINIO WD DE LOS RECEPTORES

2.1. ANÁLISIS DE ESPECIFICIDAD DE UNIÓN AL DOMINIO WD

Con el fin de establecer si realmente todos los receptores que se obtuvieron se unían de manera específica al dominio WD y no al dominio N-terminal, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación. Todos los experimentos de co-inmunoprecipitación de este capítulo se realizaron en células HEK-293T mediante la sobreexpresión de los diferentes receptores previamente etiquetados con los tags HA, GST o FLAG. Estas construcciones fueron enfrentadas contra el dominio WD de ATG16L1 (comprendido entre los aminoácidos 320 y 607), contra la región N-terminal de ATG16L1 (una construcción carente del WDD a la que se referirá a lo largo de este estudio como Δ WDD) y contra la versión completa de ATG16L1 o FL (proveniente de sus siglas en inglés "*full length*").

Los resultados obtenidos muestran que la unión de los receptores IL-4RA, IL-6RB, IL-12RB2, IL17-RD, IL-20RA, IL-21R e IL-31RA a ATG16L1 no es específica del WDD (Figura 8), ya que éstos se unen tanto al GST-WDD aislado como a una construcción de ATG16L1 carente del dominio (GST- Δ WDD en las figuras), a excepción del IL-17RD que no se une a ninguna de las construcciones de ATG16L1. Esto sugiere que estos receptores interaccionan con ATG16L1 a través de otra región además del dominio WD. Lo mismo ocurre con el receptor de la IL-31, el cual parece perder una posible banda glicosilada cuando se enfrenta a un ATG16L1 carente del dominio WDD. Lo que podría indicar que un producto glicosilado o en estadios posteriores de maduración es incapaz de unirse a ATG16L1 en ausencia del WDD (Δ WDD) (Figura 8).

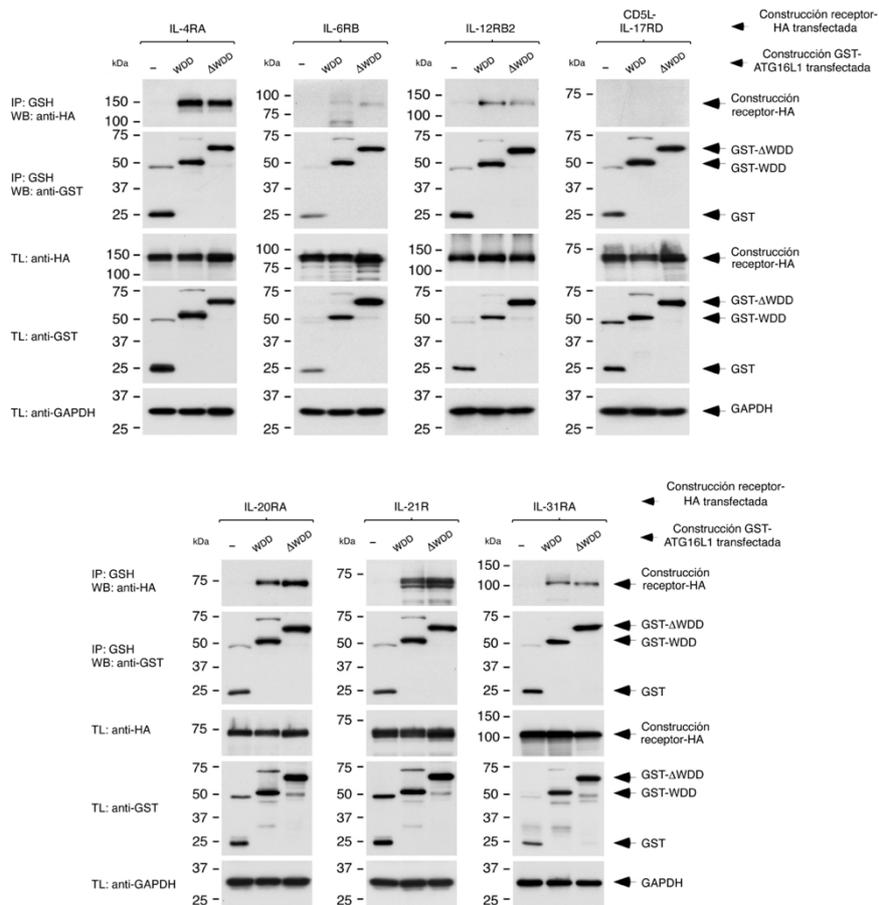


Figura 8. Colección de receptores de interleuquinas cuya unión a ATG16L1 se produce a través tanto del dominio WD como del dominio N-terminal. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con los distintos receptores (IL-4RA, IL-6RB, IL-12RB2, IL-17RD, IL-20RA, IL-21R y IL-31RA) etiquetados con HA en el C-terminal, así como con diferentes construcciones de ATG16L1 etiquetados con GST (GST-WDD, GST-ΔWDD) y usando la construcción GST (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-immunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot

Por otro lado, otra serie de receptores como IL-18R1, IL-18RAP, IL-33R (IL-1RL1) y IL-1RAP mostraron de manera consistente una unión diferencial del WDD frente al ΔWDD (Figura 9).

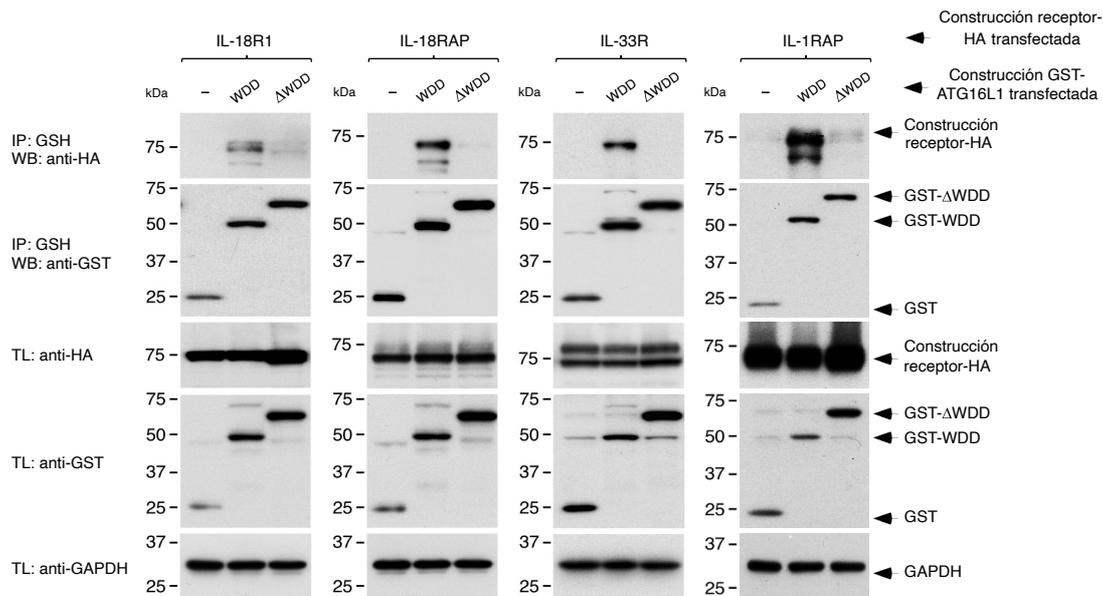


Figura 9. Colección de receptores de interleuquinas con unión WDD-dependiente a ATG16L1. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con los distintos receptores (IL-18R1, el IL-18RAP, el IL-33R (IL-1RL1) y el IL-1RAP) etiquetados con HA en el C-terminal, así como con diferentes construcciones de ATG16L1 etiquetados con GST (GST-WDD, GST- Δ WDD) y usando la construcción GST (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionadas a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Estos ensayos de co-inmunoprecipitación demuestran que el dominio WD de ATG16L1 es suficiente para interactuar con estos receptores, ya que el WDD aislado es capaz de asociarse a éstos. También se demuestra que el dominio WD es esencial para dicha interacción, ya que una versión carente del dominio WD (ATG16L1- Δ WDD) no es capaz de mantener la unión con esta colección de receptores.

Otros receptores como el IL-2RG o el IL-10RB, también fueron clasificados como WDD específicos²⁷², pero ambos se estaban estudiando en otros proyectos que en aquel momento se estaban desarrollando en el laboratorio. Como soporte para el proyecto de la IL-2RG, se realizaron

inmunoprecipitaciones “reversas”, en las que es el receptor de la interleuquina es el que esta etiquetado con GST, y por tanto el que precipitamos. Las construcciones del WDD y ATG16L1- Δ WDD están etiquetadas con HA y son los que co-inmunoprecipitan (Figura 10).

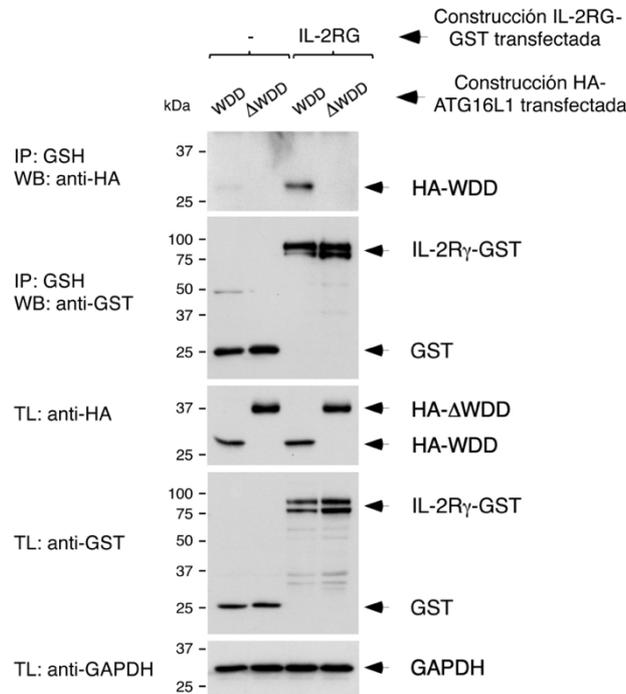


Figura 10. Inmunoprecipitación reversa del IL-2RG WDD-dependiente. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con el receptor IL-2RG etiquetado con GST en el C-terminal, así como con diferentes construcciones de ATG16L1 etiquetadas con HA (HA-WDD, HA- Δ WDD), usando un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Con el fin de confirmar que los receptores seleccionados son capaces de interactuar con la molécula de ATG16L1 completa, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre los diferentes receptores y ATG16L1-FL (“*full length*”) en comparación con la versión carente del dominio WDD (ATG16L1- Δ WDD) (Figura 11).

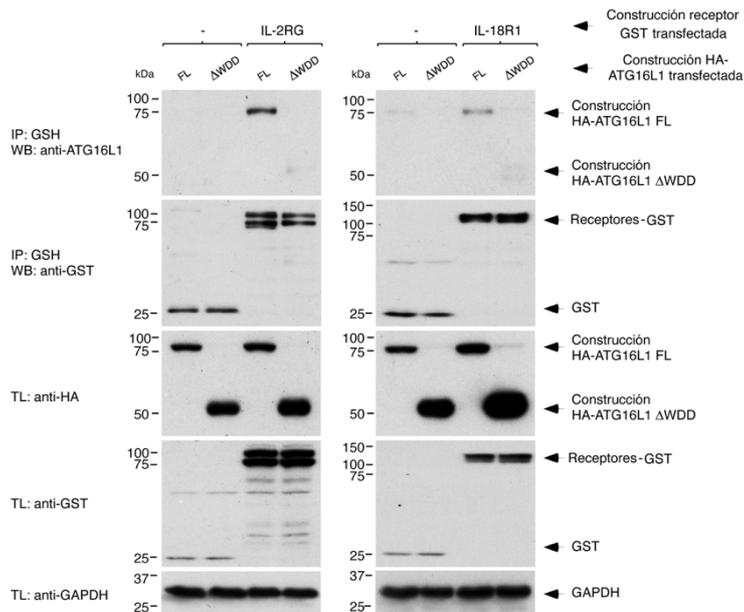


Figura 11. Los receptores IL-2RG e IL-18R1 poseen una unión defectiva al ATG16L1- Δ WDD.

Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con los distintos receptores (IL-18R1 e IL-2RG) etiquetados con GST al C-terminal, así como con diferentes construcciones de ATG16L1 etiquetados con HA (HA-ATG16L1-FL, HA- Δ WDD) y usando un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Estos experimentos confirmaron que los receptores IL-2RG y IL-18R1 (IL-2RG-GST y IL-18R1-GST) son capaces de interactuar con ATG16L1 en su versión completa (HA -ATG16L1) mientras que la versión carente del dominio WDD (HA- Δ WDD) no es capaz de retener esta unión. Esto demuestra que el IL-2RG y el IL-18R1 interactúan con ATG16L1 a través del dominio WDD de este. Esto también sugiere la idea de que, por extensión, el resto de los receptores analizados en las figuras anteriores (Figura 9) también podrían interactuar con ATG16L1 exclusivamente a través del dominio WDD de este.

2.2. GENERACIÓN DE MUTANTES PUNTUALES EN EL MOTIVO DE INTERACCIÓN DE LOS RECEPTORES CANDIDATOS

Los estudios anteriores confirmaron que la región de ATG16L1 que interacciona con estos receptores es el dominio WD. A continuación, se decidió explorar si dicha interacción ocurre verdaderamente a través del motivo identificado en las comparaciones bioinformáticas realizadas con la versión refinada del motivo.

Dado que todos los receptores obtenidos poseen una versión del motivo previamente descrito en TMEM59, se generaron mutantes puntuales en los residuos aminoacídicos previamente identificados como esenciales para la unión (los equivalentes a la Y268, E272, Y277 Y L280 en TMEM59, véase *Introducción* apartado 6. *Trabajo previo del laboratorio*). Para ello, se diseñaron versiones completas de los receptores con los residuos críticos mutados a alanina, generando así una serie de construcciones que denominaremos con un número seguido de una "M" mayúscula. El número viene definido por el número de aminoácidos del motivo que hayamos mutado a alanina, generando así versiones con un aminoácido mutado (1M) o versiones con 8 aminoácidos mutados (8M).

Algunos receptores fueron alterados con diferente número de mutaciones debido a que la flexibilidad de distancia presente en el motivo refinado pudo generar varias combinaciones posibles del motivo en la misma localización. Así, en el receptor IL-1RAP se mutaron cinco aminoácidos en dos motivos contiguos, consiguiendo así un IL-1RAP 5M¹ y un IL-1RAP 5M², en el IL-2RG y en el IL-10RB se generaron un 5M en cada uno de ellos. Del IL-12RB2 se obtuvieron dos mutantes en paralelo: un 3M y un 4M. Lo mismo ocurrió con el IL-18R1, pero sus versiones mutadas serán un 4M y un 5M. Mientras que en el caso de la IL-18RAP solo se produjo un 6M, con la IL-31RA se crearon cuatro mutantes diferentes (3M, 5M, 8M, 9M) para estudiar bien la desaparición de este posible producto

glicosilado ya descrito. Por último, del receptor IL-33R, se obtuvo una versión 5M y una versión 8M. A continuación, se muestran todos los receptores previamente mencionados junto con los motivos que se sometieron a mutaciones puntuales, los diferentes mutantes finales de cada uno de los receptores, y la posición del primer y último residuo del motivo (Tabla 3).

	POTENCIAL MOTIVO		MUTANTES PUNTALES
IL-1RAP	406	dIYvsYarnaeeeeFvIL	423
	531	LtlkWkgekSkYpqG	546
IL-2RG	293	iknLedLvteYhgnFsaW	310
IL-10RB	280	FFsFpisdendvFdkL	295
IL-12RB2	763	LvdlYkvL	770
	705	LvlsevlhqvtpvFrhP	721
IL-18RAP	380	LLYrhWieivlYrtY	395
IL-18R1	350	iYrvdlviFYrhL	362
	350	YrvdlviFYrhL	362
IL-31RA	554	WptvpnpaessiatWhgD	571
	601	kLvlDKlvnFgnvLqeiftdE	623
	601	kLvlDKlvnFgnVLqeiFtdE	623
	601	kLvlDKlvnFgnVLqeIFtdE	623
IL-33R	353	fwieatLLWrdiakpYktR	371
	353	FWieatLLWrdiakpYktR	371

Tabla 3. Motivos de los receptores de interleuquina sujetos a las mutaciones puntuales. Se diseñaron versiones completas de los receptores con ciertos residuos mutados a alanina. Esta tabla muestra estos receptores junto con los motivos que hemos mutado y los diferentes mutantes finales de cada uno de los receptores, así como la posición del aminoácido inicial y final de cada uno de los motivos. Del receptor IL-1RAP tenemos dos mutantes: IL-1RAP 5M¹ y un IL-1RAP 5M². Del IL-2RG: un 5M. Del IL-10RB: un 5M. Del IL-12RB2: un 3M y un 4M. Del IL-18R1: un 4M y un 5M. Del IL-18RAP: un 6M. Del IL-31RA: un 3M, 5M, 8M y un 9M. Del IL-33R: un 5M y un 8M.

2.3. EL MOTIVO ENCONTRADO EN EL IL-2RG Y EL IL-10RB MEDIA LA INTERACCIÓN CON EL DOMINIO WDD.

Las versiones 5M tanto de uno de los receptores de la IL-2 (HA-IL-2RG-5M) como del receptor de la IL-10 (GST-IL-10RB-5M) inhiben la interacción con el WDD de ATG16L1 (Figura 12).

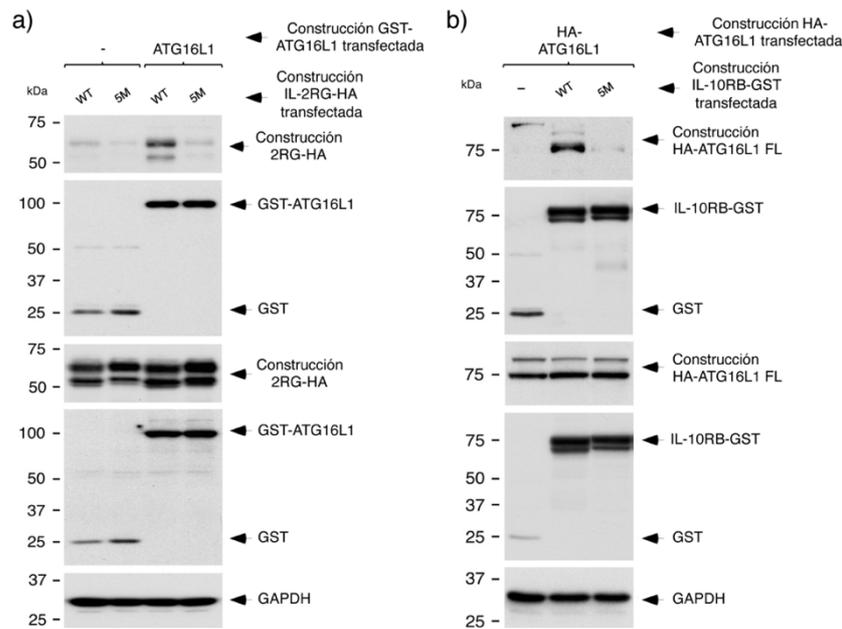


Figura 12. Las mutaciones puntuales generadas en los receptores IL-2RG (a) y IL-10RB (b) inhiben la interacción de estos con ATG16L1 FL. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con los distintos receptores (IL-2RG-HA y IL10RB-GST) en su versión WT y 5M, así como con ATG16L1 etiquetado con GST (para el IL-2RG-HA) y con ATG16L1 etiquetado con HA (para el IL-10RB-GST). En el caso del receptor IL-10RB, se utilizó la construcción GST aislada (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Este resultado confirma que los cinco aminoácidos mutados a alanina son necesarios y esenciales para que estos receptores interactúen con ATG16L1-FL. También muestra que el potencial motivo interactivo encontrado en estos dos receptores realmente media la asociación de éstos con ATG16L1. Estos datos confirman que el motivo localizado en la región intracelular es la parte del receptor encargada de la unión con el dominio GST-WDD de ATG16L1. Por otro lado, estos resultados corroboran y validan en cierta medida los microarrays como técnica a partir de la cual encontrar otras proteínas contenedoras del motivo y, por tanto, descubrir otras proteínas que sean potenciales interactores

de ATG16L1 de manera WDD dependiente. El análisis de las consecuencias funcionales de esta interacción en los casos del IL-10RB y del IL-2RG fue realizado en el contexto de otros proyectos del laboratorio²⁷².

2.4. ANALISIS DE EXPRESIÓN DE LOS MUTANTES PUNTUALES PARA EL RESTO DE INTERACTORES ESPECÍFICOS.

Antes de realizar los experimentos de co-inmunoprecipitación, se abordó un análisis de expresión de los mutantes puntuales para comprobar que el nivel de expresión es similar a la versión WT de cada receptor. Sería concebible pensar que alguna mutación pudiese interferir en cuestiones que puedan alterar su nivel de expresión como su susceptibilidad a degradación o su tráfico intracelular. A continuación, se muestran los diferentes mutantes generados, a excepción de las construcciones de los receptores de la IL-10 (IL-10RB), de la IL-2 (IL-2RG) y de la IL-31 (IL-31RA) que se generaron en el marco de otros proyectos.

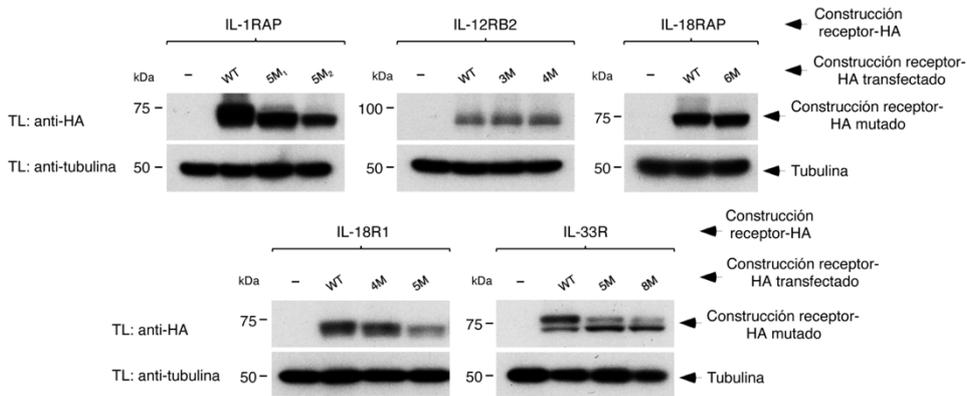


Figura 13. Análisis de los niveles de expresión de los diferentes mutantes puntuales generados. Células HEK-293-T fueron transfectadas con los distintos receptores (IL-1RAP, IL-12RB2, IL-18RAP, IL-18R1 y IL-33R) en su versión WT y sus diferentes mutantes etiquetados con HA en el C-terminal. Se utilizó un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Se observó que casi todos los mutantes puntuales se expresan al mismo nivel que la versión WT de su receptor (Figura 13). Esto sugiere que las mutaciones a alanina no tuvieron un efecto dramático a nivel de estabilidad de la proteína, lo que hizo posible que se pudiesen utilizar en ensayos de co-inmunoprecipitación.

2.5. EL MOTIVO ENCONTRADO EN LOS RECEPTORES ANALIZADOS NO MEDIA LA UNIÓN CON EL DOMINIO WD

Tras analizar los niveles de expresión de los mutantes puntuales, estos se sometieron a experimentos de co-inmunoprecipitación para testar si la alteración de los potenciales motivos de los diferentes receptores impactaba en la interacción con ATG16L1.

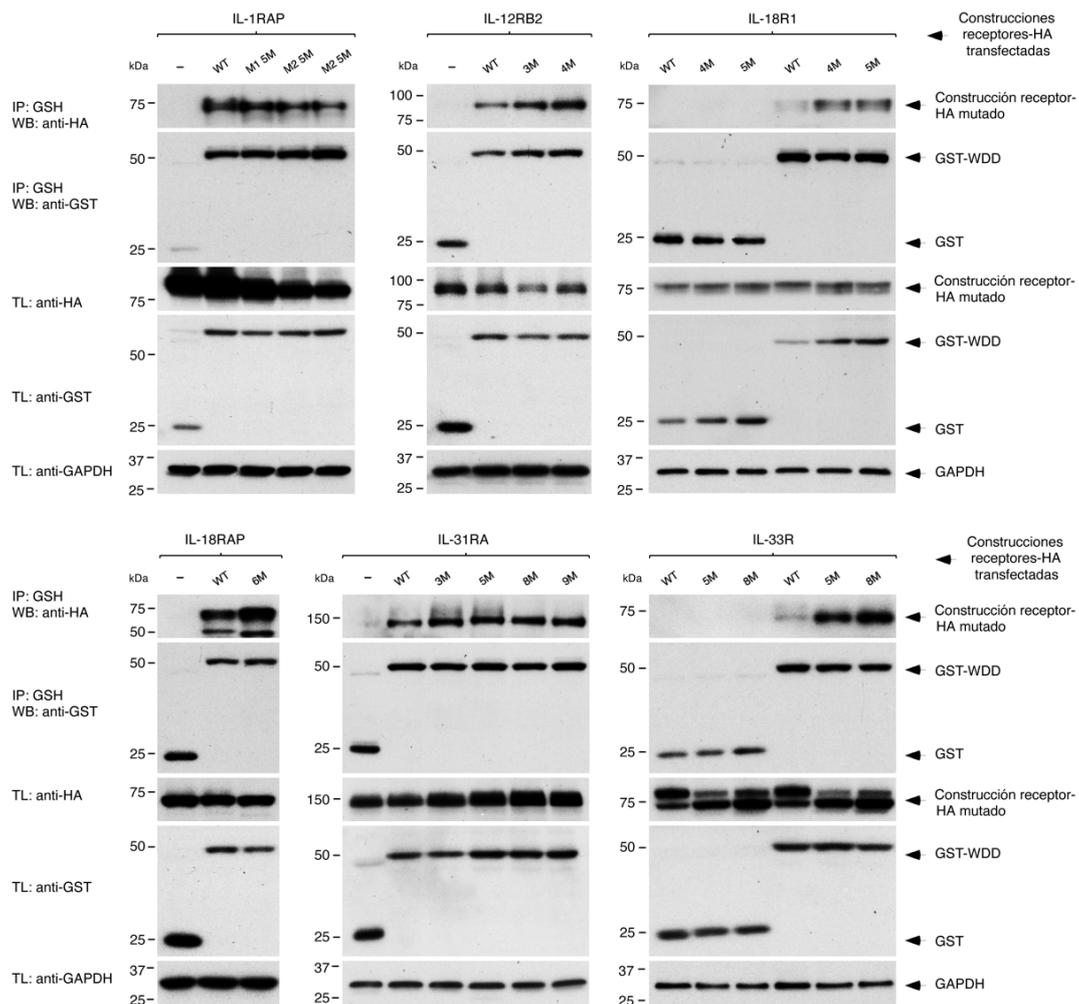


Figura 14. Las mutaciones puntuales generadas no inhiben la interacción con el dominio WDD de ATG16L1. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con los distintos receptores (IL-1RAP, IL-12RB2, IL-18R1, IL-18RAP, IL-31RA y el IL-33R (IL-1RL1)) en su versión WT y con los diferentes mutantes etiquetados con HA en el C-terminal, así como con el dominio WD de ATG16L1 etiquetado con GST (GST-WDD) y usando la construcción GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Sorprendentemente, los resultados obtenidos indican que las mutaciones generadas en el IL-1RAP, IL-12RB2, IL18R1, IL-18RAP y IL-33R (IL-1RL1) no alteran su interacción con el WDD de ATG16L1 (Figura 14) ya que todas las formas mutantes de todos los receptores son capaces de interaccionar con el WDD. Esto indica que, en estos receptores, el motivo no mediaría la unión entre estos y ATG16L1, bien sea porque esos aminoácidos concretos no intervengan en la interacción o bien sea porque verdaderamente éste no es el motivo de unión al dominio WD de ATG16L1.

De especial mención son las mutaciones de la IL-31RA: mientras que en las dos primeras mutaciones (3M y 5M) se observa que ambos productos (banda no madurada y posible producto madurado) siguen interaccionando con el dominio WDD, mutaciones más agresivas como son la versión 8M y 9M hacen que la supuesta banda madura deje de interaccionar con el dominio WDD.

3. ANÁLISIS DE RECEPTORES CUYOS MOTIVOS DE INTERACCIÓN AL WDD RESULTARON NEGATIVOS

3.1. GENERACIÓN DE DELECCIONES SERIADAS C-TERMINALES

Como se ha visto en el apartado anterior (Figura 13), seis receptores fueron negativos en los ensayos en los que se sometieron los mutantes puntuales del motivo a co-inmunoprecipitación. Esto genera una pregunta: Si el motivo de los anteriores receptores no es el responsable de la interacción con ATG16L1, ¿cuál es la región del dominio intracelular encargada?

Esta cuestión llevó a hacer un análisis más exhaustivo del dominio intracelular, con la hipótesis de que pudiese haber otras versiones del motivo, más degeneradas que el algoritmo ProSite utilizado en las comparaciones bioinformáticas no hubiese reconocido. O bien que existiesen otros motivos aminoacídicos diferentes capaces de interaccionar con el dominio WD de ATG16L1.

Para ello, se generaron deleciones seriadas del IL-18R1, IL-18RAP y del IL-33R (IL1-RL1) de entre 25-40 aminoácidos en el dominio intracelular desde el C-terminal hasta llegar al dominio transmembrana. La nomenclatura que se ha utilizado para nombrarlos es escribir la letra griega delta (Δ) seguido del primer aminoácido que ya no está presente en la deleción en cuestión. Además, a la última deleción carente del dominio intracelular completo la denominaremos Δ ID (por sus siglas en inglés "*intracellular domain*"). A continuación, se muestra un esquema de las diferentes deleciones generadas en cada uno de los receptores, así como la presencia o ausencia de las diferentes "boxes" en cada una de las deleciones (Figura 15).

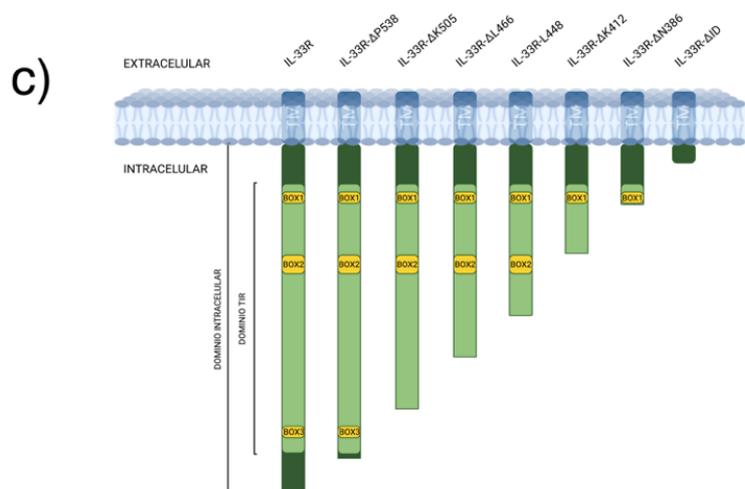
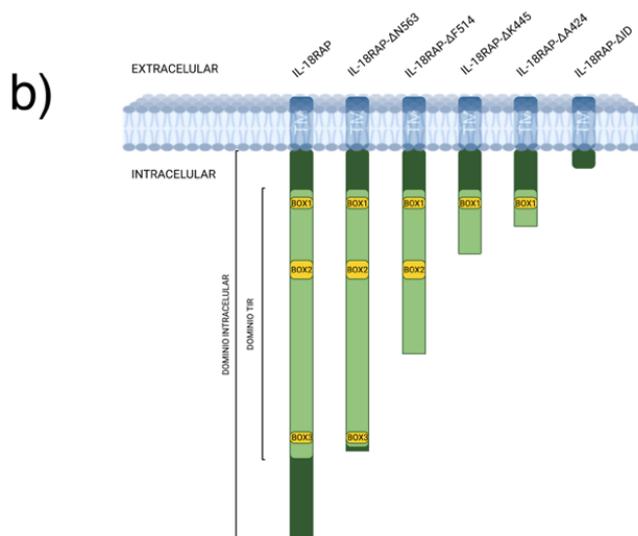
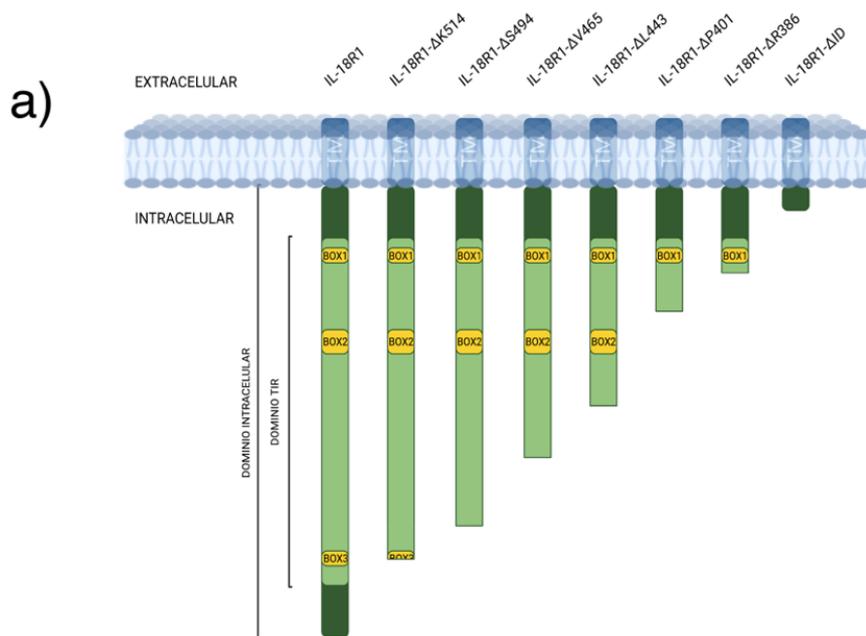


Figura 15. Esquema ilustrativo de las diferentes deleciones que generamos en los tres receptores. En los tres esquemas, las boxes están dispuestas para conocer exactamente en qué deleción se pierde la función de cada una de ellas. **a)** Las deleciones del IL-18R1: en orden decreciente serían la $\Delta K514$, la $\Delta S494$, la $\Delta V465$, la $\Delta L443$, la $\Delta P401$, la $\Delta R386$ y la ΔID . **b)** Las deleciones del IL-18RAP: en orden decreciente serían la $\Delta N563$, la $\Delta F514$, la $\Delta K445$, la $\Delta A424$ y la ΔID . **c)** Las deleciones del IL-33R (IL-1RL1): en orden decreciente serían la $\Delta P538$, la $\Delta K405$, la $\Delta L466$, la $\Delta L448$, la $\Delta K412$ y la ΔID .

3.2. EL ESTUDIO DE ESTAS DELECIONES MUESTRA OTRO POSIBLE DOMINIO DE UNIÓN AL WDD

Se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación sobre-expresando todas las deleciones, ajustando previamente el nivel de expresión de cada una de ellas para que fuese comparable, junto con el dominio WDD de ATG16L1. El objetivo era observar alguna pérdida de interacción en alguna de las deleciones. En primer lugar, se abordaron estos experimentos con uno de los receptores de la IL-18, el IL-18RAP, el cual mostró capacidad de unión al dominio WDD hasta la deleción $\Delta K445$, a partir de la cual dejaba de interactuar con este (Figura 16). Esto sugiere que la región intracelular del IL-18RAP encargada de unirse al WDD de ATG16L1 es la comprendida entre la deleción anterior, la cual todavía es capaz de mantener la unión ($\Delta F514$) y la primera que deja de unir, en este caso concreto, la $\Delta K445$.

Simplificadamente, el potencial motivo de interacción se encontraría entre la asparagina 444 (N444) y la lisina 513 (K513).

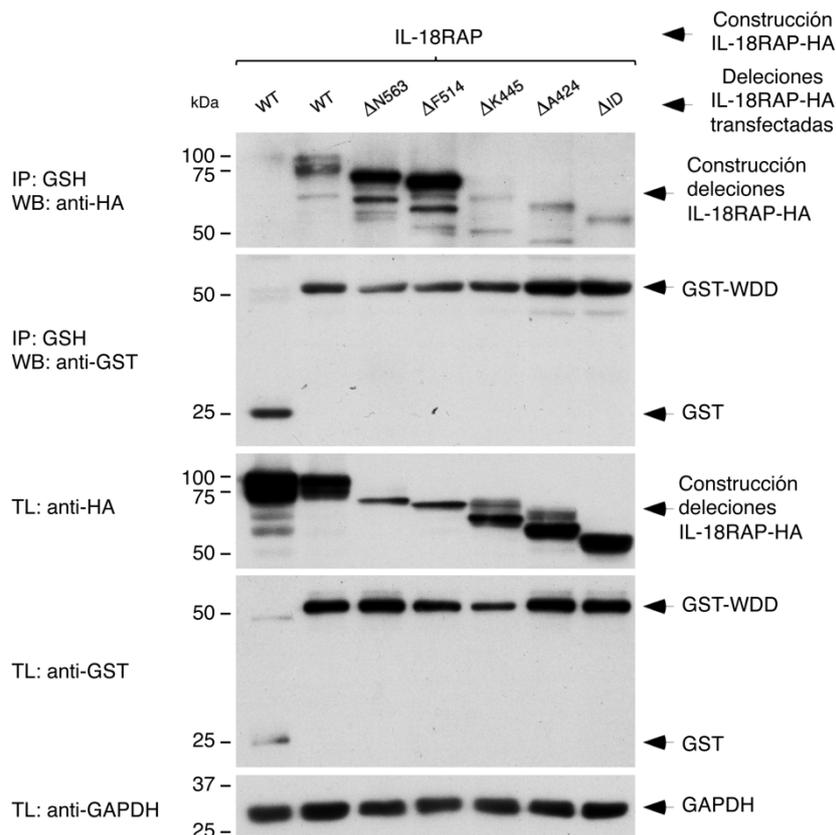


Figura 16. Las deleciones de la región intracelular del IL-18RAP localizan la posible región interactora de WDD entre las deleciones $\Delta F514$ y $\Delta K445$. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con la versión WT y con las distintas deleciones C-terminal del receptor IL-18RAP etiquetadas con HA al C-terminal, así como con el dominio WD de ATG16L1 etiquetado con GST (GST-WDD) y usando la construcción GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Posteriormente se realizaron estos mismos ensayos con otros dos receptores candidatos que fueron negativos en los ensayos de inmunoprecipitación con mutagénesis dirigida (véase *Capítulo 1 de Resultados, apartado 2.5. Ninguno de los receptores analizados se une al dominio WD a partir del motivo encontrado*). Estos fueron el otro receptor de la IL-18 (IL-18R1) así como el receptor de la IL-33 (IL-33R o IL-1RL1).

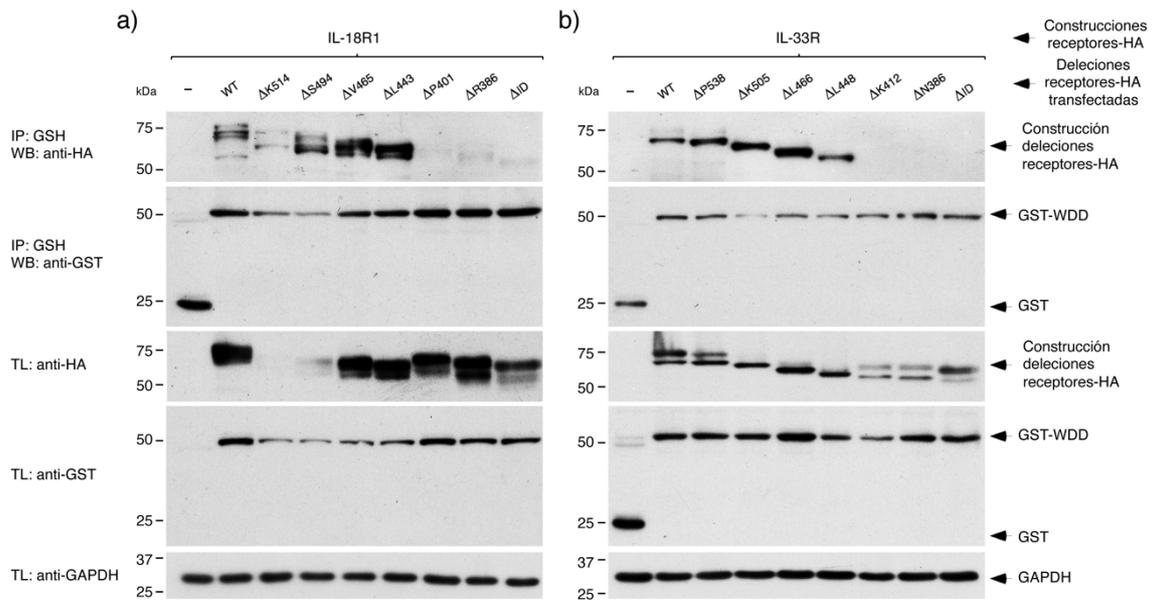


Figura 17. Las deleciones de la región intracelular del IL-18R1 y del IL-33R (IL-1RL1) localizan la posible región interactora de WDD entre las deleciones Δ L443 y la Δ P401 en el caso del IL-18R1 y entre las deleciones Δ L448 y la Δ K412 en el caso del IL-33R (IL-1RL1). Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con la versión WT y con las distintas deleciones C-terminal de los receptores IL-18R1 y IL-33R (IL-1RL1) etiquetadas con HA al C-terminal, así como con el dominio WD de ATG16L1 etiquetado con GST (GST-WDD) y usando la construcción GST aislada (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Sorprendentemente, y al igual que HA-IL-18RAP, tanto HA-IL-18R1 como HA-IL-33R (HA-IL-1RL1), perdieron también la interacción con el WDD a partir de una determinada deleción (Figura 17). En el caso del IL-18R1 es la Δ P401. Esto indica que la región comprendida entre la anterior deleción (Δ L443) y Δ P401 sería la encargada de interactuar con el dominio WDD de ATG16L1. Simplificadamente, el potencial motivo de interacción se encontraría entre la leucina 400 (L400) y la valina 442 (V442).

En el caso de la IL-33R (HA-IL1-RL1) es la Δ K412. Esto indica que la región comprendida entre la anterior delección (HA- Δ L448) y HA- Δ K412 es la encargada de interactuar con el dominio GST-WDD de ATG16L1. Simplificadamente, el potencial motivo de interacción se encontraría entre la asparagina 411 (N411) y la isoleucina 447 (I447).

3.3. ANÁLISIS DE LAS DELECCIONES RESPONSABLES DE LA INTERACCIÓN AL DOMINIO WDD

En primer lugar, se observa que las tres delecciones se encuentran dentro de los dominios TIR de los receptores. Estos dominios se han visto implicados en la señalización de diferentes tipos de receptores, así como en su oligomerización y su interacción con la maquinaria señalizadora (véase *Capítulo 1 de Resultados, apartado 1. Selección de moléculas candidatas: los receptores de interleuquinas*). Esto sugiere que la interacción entre los receptores y ATG16L1 podría tener una función en la regulación de la señalización de los receptores, bien regulando la dimerización de estos antes de iniciar la cascada de señalización o bien por efectos competitivos de ATG16L1 con proteínas de la maquinaria señalizadora de los receptores como Myd88.

Al alinear estas tres secuencias aminoacídicas con el fin de observar si existía algún residuo conservado, se observó que existía cierta homología. A continuación (Figura 18), se muestra el alineamiento de las secuencias de la región concreta donde se encontraría el nuevo motivo de unión al WDD de ATG16L1 de cada uno de los receptores estudiados. Además, en violeta se muestran los residuos más conservados.

IL-18R1	L	P	R	V	L	E	K	H	F	G	Y	S	L	C	L	L	E	R	D	V	A	P	G	G	V	Y	A	E	D	I	V	S	I	I	K	R	S	R	R	G	I	F	I	-	-	-				
IL-18RAP	-	-	-	-	-	-	N	K	Y	G	Y	K	L	C	I	F	E	R	D	V	V	P	G	G	A	V	V	D	E	I	H	S	L	I	E	K	S	R	R	L	I	I	V	L	S	P				
IL-33R	-	-	-	-	-	-	N	K	C	G	Y	T	L	C	I	Y	G	R	D	M	L	P	G	E	D	V	V	T	A	V	E	T	N	I	R	K	S	R	R	H	I	F	I	-	-	-				
IL-18R1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
IL-18RAP	N	Y	V	N	G	P	S	I	F	E	L	Q	A	A	V	N	L	A	L	D	D	Q	T	L	K	L	I	L	I	K	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
IL-33R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figura 18. Alineamiento de la secuencia de las diferentes deleciones responsables de la interacción con el dominio WD. En el análisis del alineamiento se muestra el último aminoácido que une según las deleciones que tenemos (L400 para el IL-18R1, N444 para el IL-18RAP y N411 para el IL-33R (IL-1RL1)) y el primero que deja de unir (el primero de la siguiente deleción) que según las deleciones son la V442 para el IL-18R1, la K513 para el IL-18RAP y la I447 para el IL-33R (IL-1RL1). Se muestra el alineamiento de la secuencia entre estos receptores con los aminoácidos más conservados en violeta.

Viendo que existía cierta homología entre las tres secuencias y sabiendo que las tres se encontraban dentro del dominio TIR, se decidió buscar esta secuencia en el resto de dominios TIR presentes en la naturaleza como los presentes en los receptores de interleuquinas de tipo Toll (TLRs), los receptores de interleuquinas de la familia de la IL-1, o moléculas encargadas de señalización como Myd88 o TIRAP²⁸¹ (Tabla 4).

RECEPTORES DE TIPO TOLL		RECEPTORES DE INTERLEUQUINAS	
TLR1	GMQICLHERNFVPGKSIVENIITCKEYSKYSIFV	IL-1R1	GYKLFYGRDDYVGEDIVEVINENVKSRRLI
TLR2	PFKLC LHKRDFIPGKWIIDNIDSIEKSHKTVFV	IL-1RAP	GYKLCIFDRDPLGGIVTDELSFIQKSRLLV
TLR3	SLKFCLEERDFEAGVFELEAINSIKRSKIIFV	IL-18R1	GYKLCIFERDWPGGAVVDEIHSLEKSRRLIV
TLR4	PFQLCLHYRDFIPGVAIAANIIHEGFHKSRAKVV	IL-18RAP	GYSCLLERDVAPGGVVAEDIVSIKRSRGIFI
TLR5	RFNLCFEERDFVPGENRIANIQDAIWNRSKIVCL	IL-33R (IL-1RL1)	GYTLCIYGRDMLPGEDVVTAVETNIRKSRRHFI
TLR6	DIQICLHERNFVPGKSIVENIINCKEYSKYSIFV	PROTEÍNAS ADAPTADORAS	
TLR7	HFNLCEERDWLPGOPVLENLSQSIQLSKKTVFV	Myd88	RLKLCVSDRDVLPGTGVWSIASIELIEKRCRRMVV
TLR8	NVLLCEERDWPGLAIIDNMQSINOSKKTIVFV	TIRAP (MAL)	SLRCFLQLRDATPGGAVSELCOALSSSHCRVLL
TLR9	ALRLCEERDWPGLKTLFENLWASVYGSRAKTLFV		
TLR10	SILICLYESYDFDPGKSISENIVSFKYSKYSIFV		
TLR11 (m)	GLRLCLPARDFGIGNDRMESMIASMGKSRATLCV		
TLR12 (m)	GLRLCLPERDFEPGKDVVDNVDSMLSSRTLCV		
TLR13 (m)	TFKLC LHQDRFEPGIDIFENIQAINTSRKTLCV		

Tabla 4. Secuencia conservada de las deleciones en las diferentes proteínas poseedoras de motivos TIR. En el primer bloque encontramos todos los receptores de tipo Toll humanos (TLRs h) y algunos de ratón (TLRs m) para observar cómo se mantiene la conservación entre especies. En el segundo bloque encontramos los receptores de la familia de la IL-1 que encontramos en nuestros arrays. En el último bloque encontramos proteínas adaptadoras encargadas de iniciar la señalización de los receptores, pero solo observamos secuencias conservadas en Myd88 y una proteína adaptadora de esta (MAL o TIRAP), mientras que otras proteínas adaptadoras como TRIF, TRAM o SARM, famosas por poseer dominios TIR, no comparten homología en esta región.

Al enfrentar todas estas secuencias que se encuentran embebidas en los dominios TIR, se observa la existencia de una serie de aminoácidos muy conservados que se relacionan directamente con lo que se llama “box 2” (Figura 19a), una región ya caracterizada que está encargada de interacciones homotípicas (TIR-TIR) y tiene también un papel en señalización celular, algo que ya se mencionó previamente (véase *Capítulo 1 de Resultados, apartado 1. Selección de moléculas candidatas: los receptores de interleuquinas*) y que discutiremos más adelante (véase *Discusión*). Además, justo después de esta “box 2” encontramos una zona también bastante conservada de la que no hay biografía (Figura 19b), lo que deja abierta una puerta para dilucidar cuál de las dos regiones conservadas es la encargada de interactuar con ATG16L1.

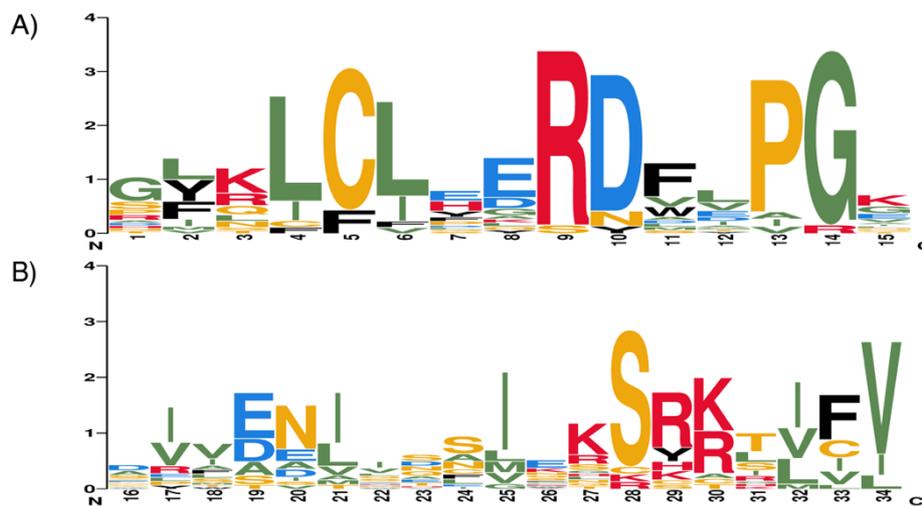


Figura 19. Logo de secuencias de la región deletada donde se encuentra el posible motivo interactivo de ATG16L1. Mediante la aplicación web WebLogo, hemos construido un mapa de frecuencias al enfrentar las secuencias de la región deletada de nuestros tres receptores junto con las secuencias de esa región del resto de proteínas contenedoras del dominio TIR. Cuanto más grandes son las letras, más probabilidad existe que en esa posición concreta se encuentre ese aminoácido. Los aminoácidos no polares se encuentran coloreados en verde, los polares sin carga se encuentran en amarillo, los cargados positivamente (aminoácidos básicos) se muestran en rojo mientras que los aminoácidos cargados negativamente (aminoácidos ácidos) se muestran en azul. Por último, los aminoácidos aromáticos se muestran en negro.

CAPITULO 2. TMEM59 Y SU PAPEL EN
AUTOFAGIA NO CANÓNICA.

1. TMEM59 Y SU RELACIÓN CON LA BIOLOGÍA LISOSOMAL

1.1. GENERACIÓN DE MEFs DEFICIENTES EN TMEM59 RECUPERADOS CON TMEM59-mRFP

Trabajo previo del laboratorio demostró que TMEM59 se expresa a lo largo de la ruta endolisosomal¹⁸⁶, sugiriendo que su capacidad de lipidar LC3 en sus propias vesículas se desarrolle en algún punto de esta ruta o en el propio lisosoma.

Anteriormente en el laboratorio, se generaron ratones deficientes en TMEM59 gracias al empleo de la técnica CRISPR. A partir de estos animales, se derivaron dos estirpes de MEFs deficientes en TMEM59: i) los generados a partir de una deleción de 8 nucleótidos (nombrados estirpe -8 en este trabajo) y ii) los generados a partir de una inserción de 8 nucleótidos (nombrados estirpe +8 en este trabajo). Los experimentos realizados en esta tesis doctoral se realizaron principalmente con la estirpe generada a partir de la inserción de 8 nucleótidos (MEFs +8).

Estos MEFs deficientes en TMEM59 se utilizaron para generar una estirpe derivada que expresaba de manera estable una quimera de TMEM59 con una etiqueta fluorescente fusionada en el C-terminal: la proteína roja fluorescente monomérica (TMEM59-WT-mRFP). Además, también se expresó de manera estable una forma mutada de TMEM59 en los cuatro aminoácidos críticos para que motivo de interacción a ATG16L1 fuese funcional (véase Figura 6a) y por tanto incapaz de asociarse con ATG16L1 (TMEM59-4M-mRFP).

Debido a que previamente se había observado que la sobreexpresión de TMEM59 producía cierta toxicidad y cambios en la morfología celular, se realizaron tres diluciones en la transducción retroviral con objeto de minimizar

el posible efecto citotóxico que produce la sobreexpresión de TMEM59 (véase 3. *Materiales y métodos apartado 2.1. Transducción mediante retrovirus*).

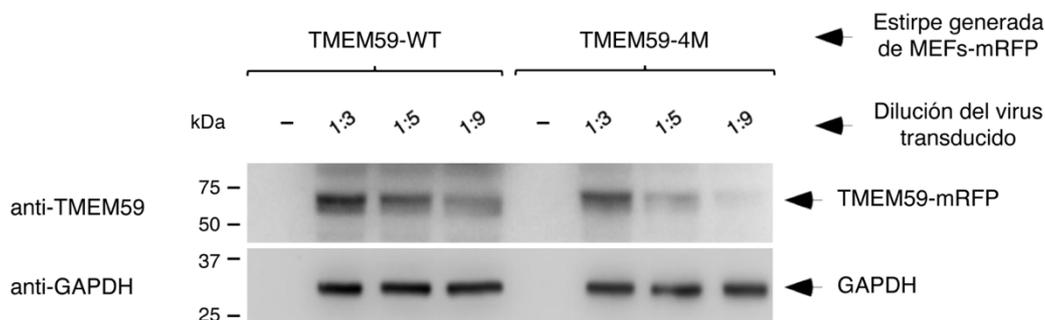


Figura 20. La sobreexpresión estable se produce de manera diferencial entre la versión WT y la versión 4M de TMEM59-mRFP. Los MEFs TMEM59 KO (+8) fueron transducidos con la versión WT (TMEM59-WT-mRFP) y la versión 4M (TMEM59-4M-mRFP) de TMEM59. Tras una semana en selección con puromicina (1 μ g/ml), las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados para observar la recuperación de las estirpes celulares generadas.

El resultado de las distintas diluciones generadas (1:3, 1:5 y 1:9) mostró que la expresión entre la versión WT y la versión 4M de TMEM59 no era comparable entre las diluciones (Figura 20). Por esto, durante todo este trabajo se utilizaron la dilución 1:5 para las células recuperadas con la versión WT (TMEM59-WT-mRFP) y la dilución 1:3 para las células recuperadas con la versión 4M (TMEM59-4M-mRFP).

1.2. TMEM59 PUEDE CONTROLAR LA CANTIDAD Y DISTRIBUCIÓN DE LOS LISOSOMAS

Una vez generadas estas estirpes, se decidió analizar si la expresión de TMEM59 podría afectar de algún modo a la biología lisosomal. Para ello, la estirpe +8 (MEFs WT, MEFs TMEM59 KO, MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP y MEFs TMEM59 KO + TMEM59-4M-mRFP) fue transducida con

la proteína lisosomal LAMP1 fusionada en su C-terminal a GFP (LAMP1-GFP) en dilución 1:1 y posteriormente sometidas a inmunofluorescencia.

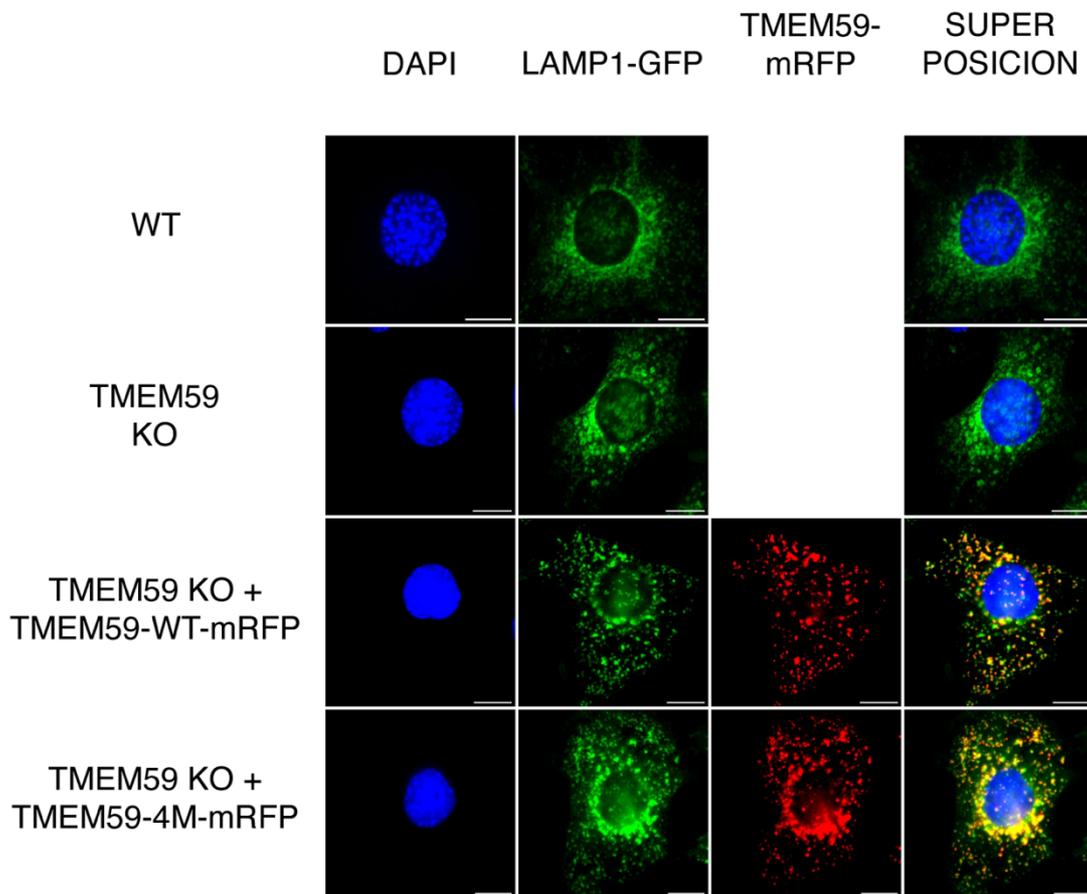


Figura 21. Los distintos niveles de TMEM59 no alteran la localización ni la morfología de las estructuras LAMP1 positivas. Los MEFs (+8) (MEFs WT, MEFs TMEM59 KO, MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP y MEFs TMEM59 KO + TMEM-4M-mRFP) fueron transducidas en dilución 1:1 con LAMP1-GFP. Las células se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI (1:10000), en verde se muestra LAMP1-GFP y en rojo se muestra TMEM59-mRFP. Las imágenes fueron elegidas como las representativas de los fenotipos observados. Todas las barras de escala representan 10 μ m.

En los resultados obtenidos no se observa ningún cambio en la señal de LAMP1 en ausencia de TMEM59 (segunda columna: MEFs TMEM59 KO) con respecto a su control (primera columna: MEFs WT). Esto sugiere la idea de que la ausencia de TMEM59 no parece tener un impacto dramático en la maduración o número de lisosomas.

Por el contrario, sí que se aprecia un cambio sustancial entre las dos primeras condiciones y los MEFs recuperados con TMEM59 tanto en su versión WT como en su versión 4M. En estas últimas, LAMP1-GFP parece expresarse más y en mayor número de vesículas. Además, se observa una fuerte co-localización con TMEM59-mRFP (Figura 21) lo que sugiere que TMEM59 se encuentra principalmente en los lisosomas. Asumiendo que su sobreexpresión es capaz de activar sus funciones autofágicas no canónicas, este resultado apunta a un posible papel regulador por parte de TMEM59 en la biología del lisosoma ya sea promoviendo biogénesis lisosomal o dirigiendo éstos a destinos subcelulares concretos.

1.3. TMEM59 ES UNA PROTEÍNA LISOSOMAL

LAMP1 constituye alrededor del 50% de las proteínas lisosomales²⁸⁷ y es uno de los marcadores más ampliamente utilizados para marcar éstos en ensayos de inmunofluorescencia. Dada la cercanía observada entre LAMP1 y TMEM59 (Figura 21) se hipotetizó sobre la posibilidad de que TMEM59 fuese una proteína netamente lisosomal, ya que los datos hasta ahora recabados por el laboratorio no la situaban en ningún compartimento específico de la ruta endolisosomal.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencias con las estirpes recuperadas con TMEM59-mRFP tanto en su versión WT (TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP) como en su versión 4M (TMEM59 KO + TMEM59-4M-mRFP) con el fin de obtener un número suficiente de muestras con el que posteriormente analizar la co-localización de manera robusta. El parámetro estadístico utilizado fue el coeficiente de Manders. Este es un valor que va de 0 a 1. El cero implica la ausencia de co-localización mientras que el valor de 1 indica una co-localización total.

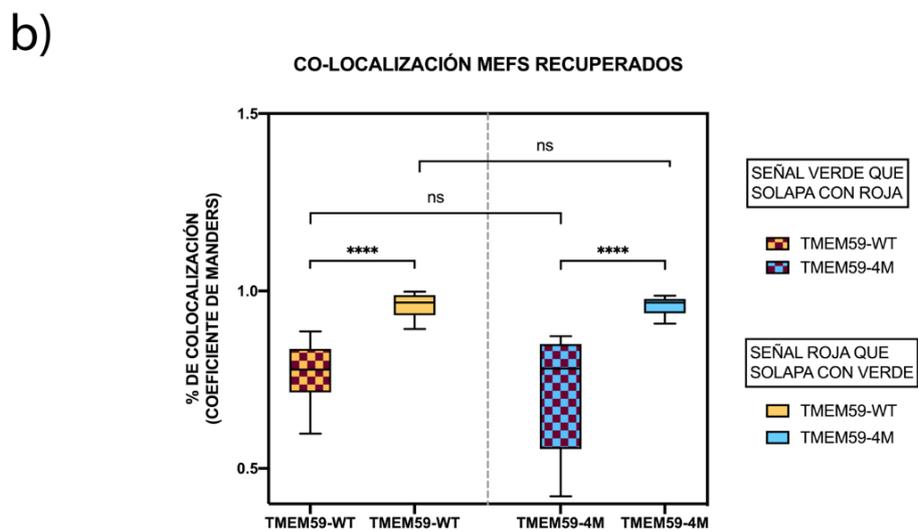
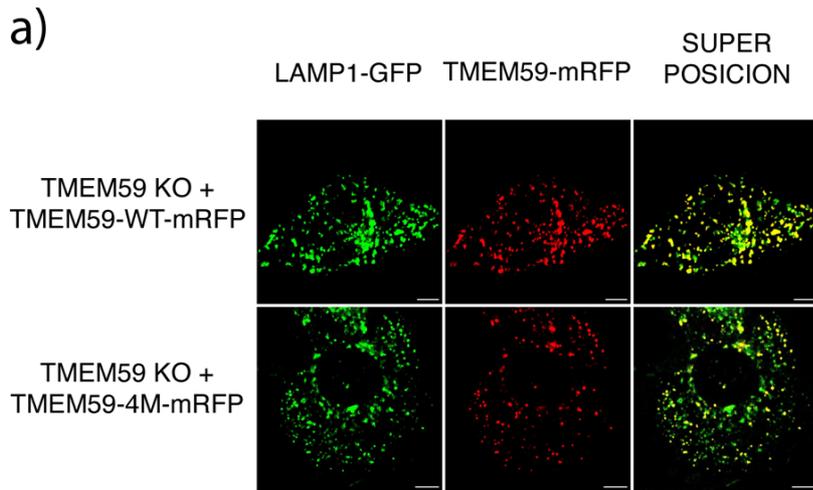


Figura 22. TMEM59 co-localiza de manera fisiológica con LAMP1 en el lisosoma. a) La estirpe +8 transducidos en dilución 1:1 con LAMP1-GFP fueron fijadas con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia. En verde se muestra LAMP1-GFP y en rojo se muestra TMEM59-mRFP. Las imágenes fueron saturadas en esta figura para obtener una mejor visualización de los fenómenos de co-localización. Las imágenes fueron elegidas como las representativas de los fenotipos observados. Todas las barras de escala representan 10 μ m. **b)** La gráfica muestra los análisis de co-localización usando el coeficiente de Manders. En amarillo se representa la estirpe recuperada con la versión WT de TMEM59, en azul se representa la estirpe recuperada con la versión 4M de TMEM59. Además, se analizaron dos parámetros: la señal verde que solapa con la roja (representados con cuadrados marrones) y la señal roja que solapa con el verde (color en fondo liso). Se analizaron 15 células en cada una de las condiciones. El tratamiento estadístico se realizó mediante el cálculo de la t de student no pareada; n.s. indica un p-valor>0,05; * indica un p-valor<0,05; ** indica un p-valor<0,01; *** indica un p-valor<0,001; **** indica un p-valor<0,0001.

En estos estudios se observó una fuerte co-localización entre ambas proteínas lo que indica que tanto LAMP1 como TMEM59 se encontrarían en el mismo compartimento: el lisosoma (Figura 22a).

Se observa también que prácticamente la totalidad de la señal de TMEM59 (visualizada en rojo) co-localiza con LAMP1, pero no toda la señal de LAMP1 (visualizada en verde) co-localiza con TMEM59 (Figura 45a). Esto indica por un lado que todos los compartimentos TMEM59 positivos (señal roja) son también compartimentos LAMP1 positivos (cajas amarillas y azul lisas) pero, por otro lado, que no todos los compartimentos LAMP1 positivos (señal verde) son compartimentos TMEM59 positivos (cajas amarillas y azul con cuadrados marrones). Los datos numéricos indican que solo alrededor de un 75% de los compartimentos LAMP1 positivos poseen TMEM59 en su membrana (Figura 22b). Estos resultados sugieren la existencia de dos tipos de lisosomas diferentes: unos que carecen de TMEM59 y otros TMEM59 positivos.

También se observa que la versión 4M de TMEM59 se comporta como su versión WT, lo que sugiere que la mutación del motivo pro-autofágico y la ausencia de unión de este a ATG16L1 no tienen ningún impacto en la localización subcelular de TMEM59 (Figura 22b).

2. ANÁLISIS DE TMEM59 DENTRO DE LA RUTA NO CANÓNICA

2.1. LOS AMINOÁCIDOS F467 Y K490 NO SON NECESARIOS PARA LA INTERACCIÓN ENTRE ATG16L1-TMEM59

Dado que el motivo aminoacídico encontrado en TMEM59 se une directamente al dominio WD y dado que TMEM59 se ha visto implicado en funciones autofágicas no convencionales¹⁸⁶, se hipotetizó que los

aminoácidos descritos en la literatura como esenciales para mediar la autofagia no canónica (véase *Introducción apartado 4. Autofagia no canónica*): la F467 y la K490 pudiesen estar implicados en la interacción con TMEM59. Para explorar esta cuestión, se generaron construcciones del dominio WD con estos residuos mutados a alanina. Antes de realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación, se testaron sus niveles de expresión para controlar que todos se expresan por igual y que estas mutaciones no les afectan de manera dramática (Figura 23).

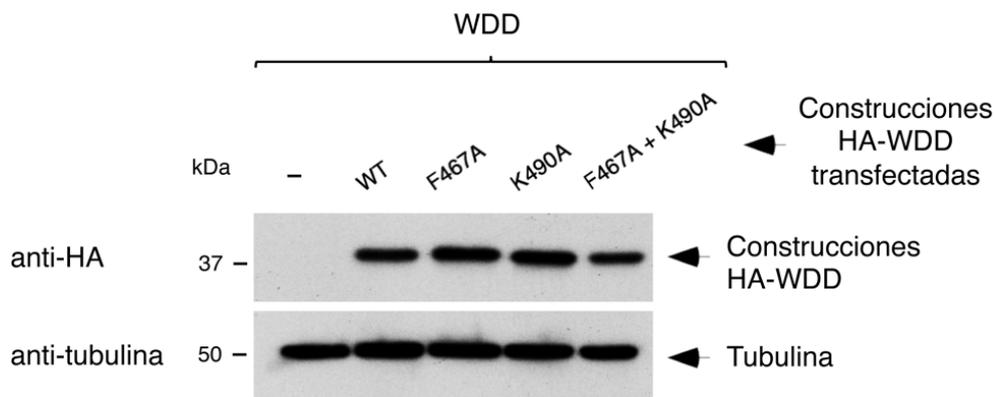


Figura 23. Los niveles de expresión de los mutantes generados son equiparables entre sí. Niveles de expresión de la construcción WDD WT y sus mutantes. Células HEK-293T se transfectaron con un vector vacío (-) y la versión WT junto con los diferentes mutantes (F467A, K490A y F467A + K490A) de ATG16L1 taguados con HA. 36 horas post-transfección se lisaron y se procesaron mediante Western Blot usando los anticuerpos indicados a la izquierda.

Tras observar que todos los mutantes se expresan por igual, se procedió a realizar los ensayos de co-inmunoprecipitación enfrentando tanto la versión WT como los mutantes del dominio WDD (HA-WDD-WT, HA-WDD-F467A, HA-WDD-K490A, HA-WDD-F467A + K490A) a TMEM59 (TMEM59-GST).

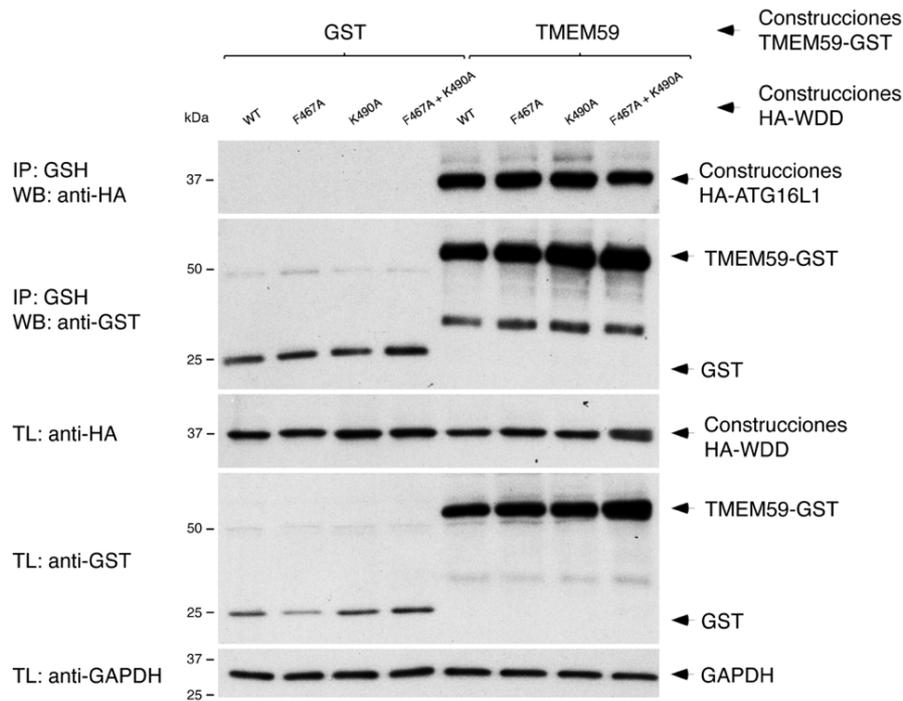


Figura 24. Las mutaciones F467A, K490A y la doble mutación no alteran la asociación entre TMEM59 y el dominio WD de ATG16L1. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con la versión WT y los distintos mutantes (F467A, K490 y F467A + K490A) de ATG16L1, tagueados todos con GST. Se utilizó un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Estos ensayos de co-inmunoprecipitación mostraron que todas las mutaciones del dominio WDD, junto con la versión WT como control, mantienen intacta la interacción con TMEM59 (TMEM59-GST) (Figura 24). Datos similares fueron obtenidos al realizar estos ensayos tras introducir estas mismas mutaciones en la molécula completa de ATG16L1 (Figura 25). Ambos ensayos solidifican la idea de que verdaderamente estos aminoácidos no participan en la unión con TMEM59.

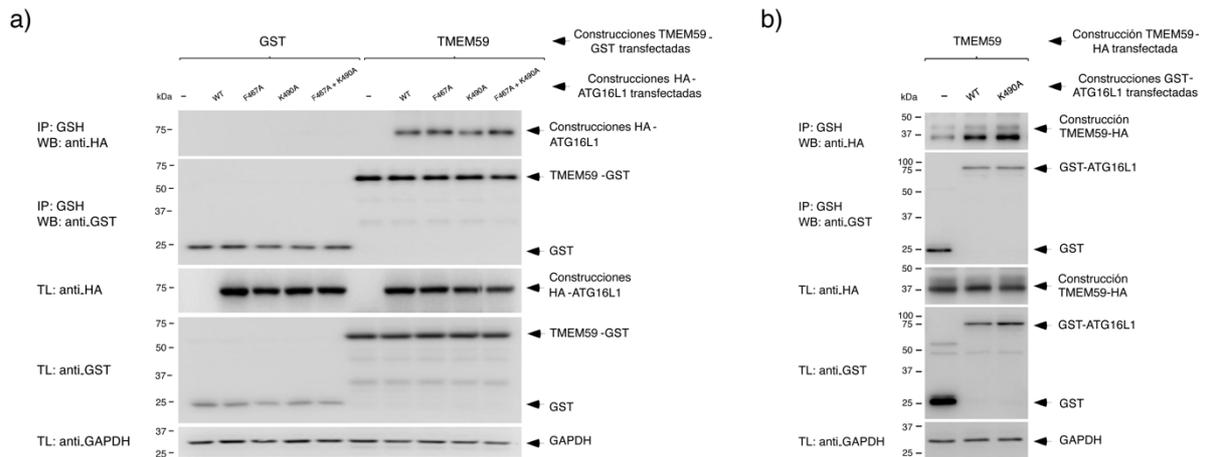


Figura 25. Las mutaciones F467A, K490A y la doble mutación no alteran la asociación entre

TMEM59 y ATG16L1. a) Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con la versión WT y los distintos mutantes (F467A, K490 y F467A + K490A) de ATG16L1, tagueados todos con HA. Se enfrentaron todas a una construcción de TMEM59-GST. Se utilizó una construcción GST (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados. **b)** Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con la versión WT y el mutante K490A de ATG16L1, tagueados con GST. Se enfrentaron a una construcción de TMEM59-HA. Se utilizó un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Ya que estos residuos están implicados en la interacción directa entre el dominio WD de ATG16L1 y la v-ATPasa, mediando procesos de autofagia no canónica (véase *Introducción* apartado 4. *Autofagia no canónica*), se postula que las regiones del dominio WD de ATG16L1 que interaccionan tanto con TMEM59 como con la v-ATPasa son fundamentalmente diferentes. Esto sugiere que las actividades autofágicas no canónicas de TMEM59, aun estando mediadas por ATG16L1, podrían ser independientes del eje ATG16L1-v-ATPasa.

2.2. LOS RESIDUOS F467 Y K490 MEDIAN LA LIPIDACIÓN DE LC3 PRODUCIDA POR TMEM59

A continuación, se evaluó si las mutaciones F467A y K490A eran capaces de inhibir la lipidación de LC3 provocada por TMEM59.

Con el objetivo de explorar esta hipótesis se utilizaron células HCT ATG16^{-/-} cuyo fondo genético era nulo para ATG16L1 (véase *Materiales y métodos* apartado 1. *Líneas celulares*) para expresar de manera estable mediante transducción retroviral (véase *Materiales y métodos* apartado 2.1. *Transducción mediante retrovirus*) las versiones mutadas de ATG16L1 (F467A, K490A y el doble mutante). Los resultados de esta transducción indican que los niveles de expresión de todas las versiones de ATG16L1 fueron comparables (Figura 26).

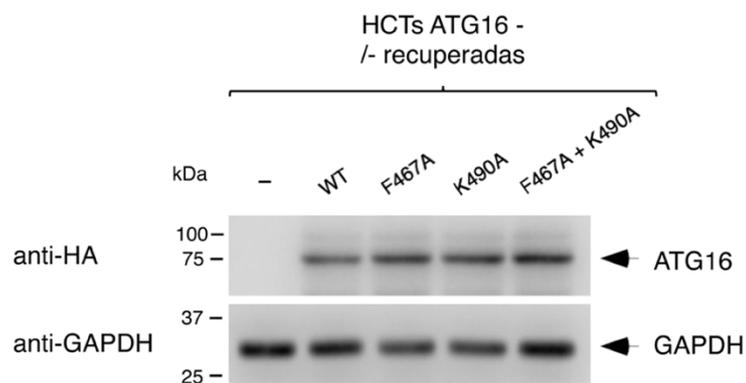


Figura 26. Los mutantes generados en las HCTs se expresan de manera equiparable. Células HCT ATG16L1^{-/-} fueron transducidas con la versión WT y los distintos mutantes (F467A, K490 y F467A + K490A) de ATG16L1. Se utilizaron las células sin transducir como control. Las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados para observar la recuperación.

Una vez se generó esta herramienta, se comprobó que efectivamente los mutantes eran incapaces de inducir la lipidación de LC3 en respuesta a la alteración lisosomal inducida por la droga monensina. Para ello, se trataron las células con monensina a 100 μ M durante una hora, condiciones establecidas anteriormente como suficientes para acoplar ambas porciones

de la v-ATPasa y activar la autofagia no canónica (véase *Figura 6c* en *Introducción*).

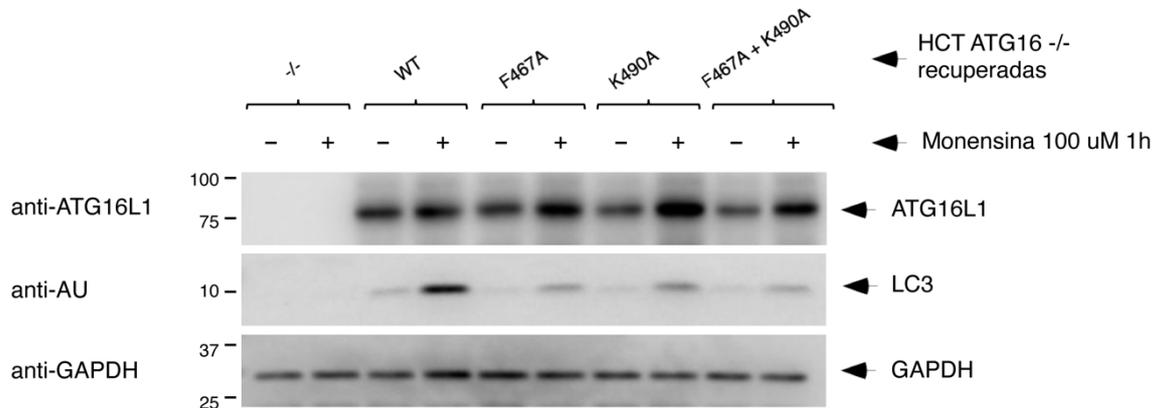


Figura 27. Los mutantes F467A, K490A y el doble mutante no son capaces de lipidar LC3-II ante la activación de la autofagia no canónica por monensina. Células HCT ATG16L1 $-/-$, así como recuperadas con la versión WT y los distintos mutantes (F467A, K490 y F467A + K490A) de ATG16L1 fueron tratadas durante 1 hora con monensina 100 μ M. Tras el tratamiento, las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

En consistencia con publicaciones previas¹⁹³, los resultados muestran que sólo las HCTs recuperadas con la versión WT de ATG16L1 son capaces de lipidar LC3 robustamente en respuesta al tratamiento. Las estirpes de HCT recuperadas con los diferentes mutantes presentan inducciones débiles en respuesta a la activación de la ruta no canónica (Figura 27).

A continuación, se repitió el mismo experimento utilizando en este caso la sobreexpresión de TMEM59 (TMEM59-HA) como estímulo para inducir LC3 en todas las estirpes de HCTs recuperadas.

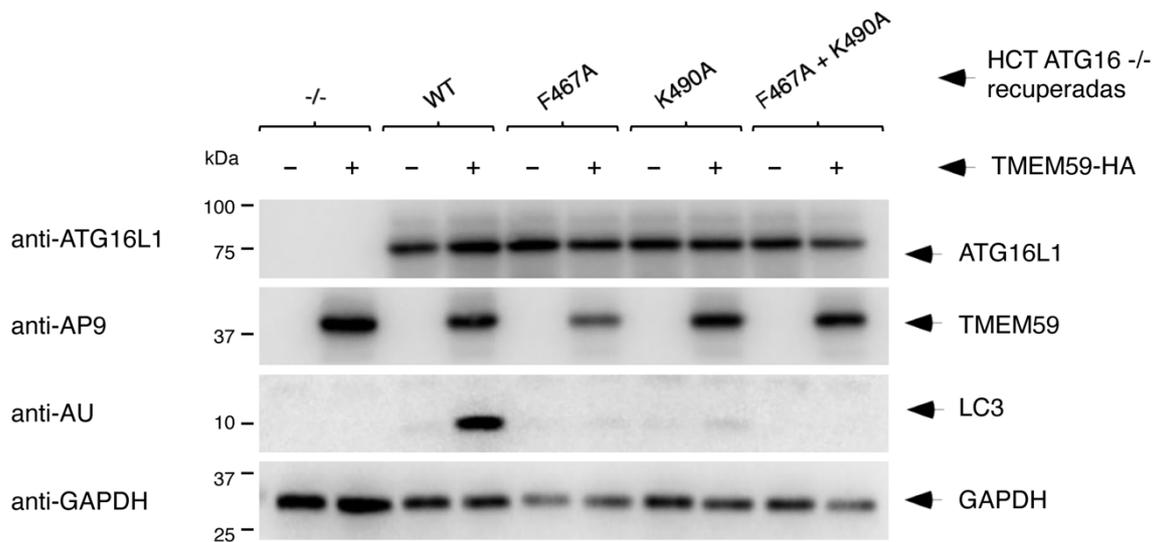


Figura 28. La sobreexpresión de TMEM59 no consigue lipidar LC3-II en presencia de los mutantes F467A, K490A y el doble mutante. Células HCT ATG16L1 ^{-/-}, así como recuperadas con la versión WT y los distintos mutantes (F467A, K490 y F467A + K490A) de ATG16L1 fueron transfectadas con TMEM59-HA. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Sorprendentemente, los resultados muestran como la sobreexpresión de TMEM59 no es capaz de lipidar LC3 en presencia de los mutantes de ATG16L1. La hipótesis hasta entonces en el laboratorio era que la capacidad lipidora de TMEM59 podría ejecutarse a través de la interacción directa con ATG16L1 y de forma independiente de la v-ATPasa. Estos resultados sugieren que los mutantes F467A y K490A, y por tanto el eje ATG16L1-v-ATPasa están implicados de alguna manera en las funciones de lipidación de LC3-II de TMEM59.

2.3. TMEM59 NO ES NECESARIO EN LA LIPIDACIÓN DE LC3

POR PARTE DE LA AUTOFAGIA NO CANÓNICA

Dado que posiblemente TMEM59 ejerza su función autofágica a través de la v-ATPasa, se hipotetizó acerca de si TMEM59 pudiese mediar la autofagia no canónica en respuesta a disfunción lisosomal. Para ello, se utilizó la estirpe +8 de los fibroblastos de embriones de ratón (MEFs) previamente generados (véase apartado 1.1. *Generación de MEFs deficientes en TMEM59 recuperados con TMEM59-mRFP*).

Estos fueron tratados con monensina con el fin de activar la autofagia no canónica y observar si en ausencia de TMEM59 (MEFs TMEM59 KO) o en sobreexpresión controlada (MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP) esta ruta se veía afectada, utilizando como sistema reportero la lipidación de LC3.

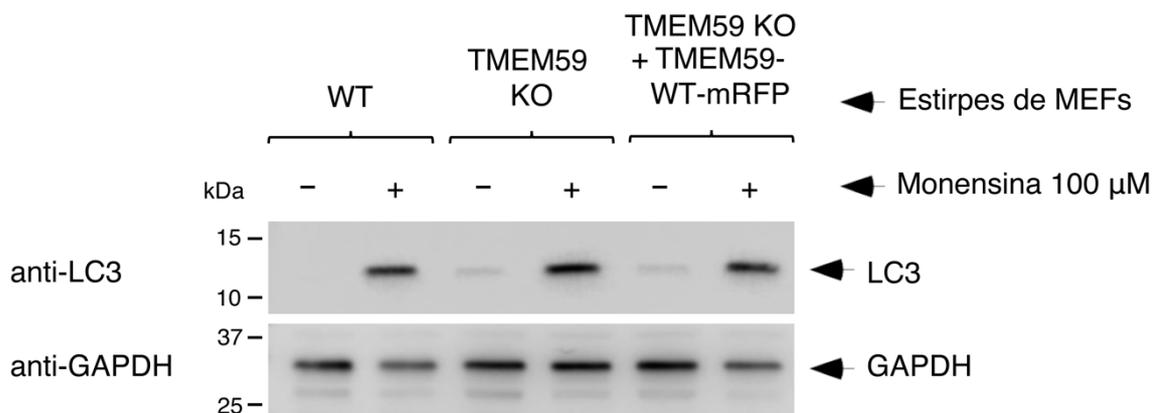


Figura 29. La ausencia de TMEM59 no impacta en la lipidación de LC3-II por monensina.

Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) fueron tratados durante 1 hora con monensina a 100 μ M. Tras el tratamiento, las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Estos resultados demuestran que la ausencia de TMEM59 no altera la respuesta autofágica no canónica inducida por monensina (Figura 29), indicando que éste no es un componente esencial esta ruta.

2.4. SopF, UNA PROTEÍNA BACTERIANA COMO HERRAMIENTA PARA ESTUDIAR TMEM59

Recientemente, Yue Xu et. al descubrieron que una proteína presente en *Salmonella*, SopF, es capaz de inhibir la autofagia no canónica inducida como defensa contra el fagosoma bacteriano. Este efecto de SopF se produce debido a la ribosilación de la glutamina 124 (Q124) de una de las subunidades de la porción transmembrana de la v-ATPasa (V_0c). Esto provoca la disociación de ATG16L1 de la porción citosólica de la v-ATPasa (V_1)²¹² y por tanto inhibiendo su actividad enzimática. Se decidió comenzar a utilizar esta proteína bacteriana debido a su interés como herramienta para bloquear la autofagia no canónica. Además, se generaron vectores de expresión de una subunidad representativa de cada porción de la v-ATPasa con objeto de estudiar su posible asociación con TMEM59 (V_0c en el caso de la porción transmembrana o V_0 , y la V_1A en el caso de la porción citosólica o V_1). Primero se sobreexpresaron estas tres proteínas en células 293T con el fin de analizar sus niveles de expresión. En el caso de SopF, como se adquirió ya etiquetada con GFP, sus niveles de expresión se compararon con un vector que contenía GFP aislado (Figura 30b).

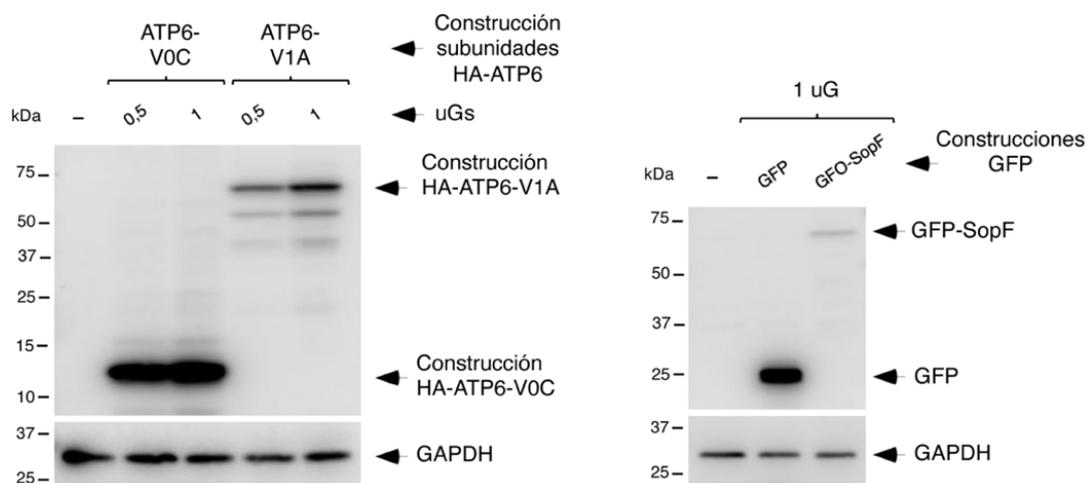


Figura 30. Niveles de expresión de las proteínas ATP6-V₀c, ATP6-V₁A y GFP-SopF. Células HEK-293T transfectadas con las diferentes construcciones (HA-ATP6-V1A, HA-ATP6-V0C y GFP-SopF). 36 horas post-transfección, las células fueron lisadas y las muestras procesadas mediante Western Blot con los anticuerpos indicados.

Con el fin de establecer si la autofagia inducida por TMEM59 es sensible a SopF, se realizaron experimentos de transfección en los que, en ausencia o presencia de SopF se analizó la capacidad de lipidación de LC3 (AU-LC3 en este ensayo) tanto de monensina como de TMEM59.

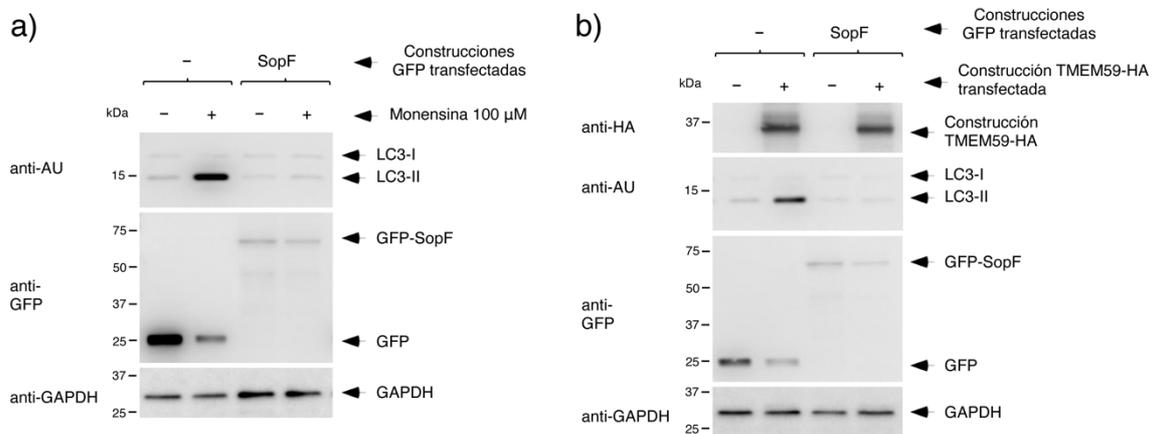


Figura 31. Estudio de SopF inhibiendo la lipidación de LC3-II. **a)** Células HEK-293T fueron tratadas durante 1 hora con monensina 100 μM. **b)** Células HEK-293T fueron co-transfectadas con TMEM59-HA o con vector vacío, en ausencia o presencia de SopF transfectado (GFP-SopF). Tras el tratamiento, las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Este estudio mostró que SopF no solo imposibilita la lipidación del LC3 tras el tratamiento con monensina 100 μM durante 1 hora (Figura 31a), sino que también es capaz de reprimir la lipidación de LC3-II producida por la sobreexpresión de TMEM59 (TMEM59-HA) (Figura 31b). Estos resultados indican que la actividad autofágica no canónica de TMEM59 es sensible a la expresión de SopF.

Hasta ahora, se bloqueó de dos maneras diferentes la ruta no canónica (mediante los mutantes del dominio WD y mediante la proteína bacteriana SopF). En ambos casos se observó inhibición de la lipidación de LC3-II por parte de TMEM59. Estos resultados invitaron a pensar que, de alguna manera, las funciones autofágicas no canónicas de TMEM59 podrían solapar en algún punto con las funciones de la v-ATPasa.

2.5. ESTUDIOS DE RIBOSILACIÓN DE SopF

Yue Xu et. al. en su estudio de SopF, estudian la ribosilación de la V_{0c} mediante ensayos de Western Blot, donde observan un cambio de movilidad electroforética de ésta en presencia de SopF. Más tarde confirman que este cambio se trata de la V_{0c} glicosilada.

Dado que SopF es una ribosil-transferasa de origen bacteriano, sería posible que pudiese tener otros substratos además de V_{0c} . Es decir, podría ribosilar residuos de otras proteínas y, por tanto, inactivar otras funciones que pudiesen estar interfiriendo en el correcto funcionamiento de éstas. En la figura anterior (Figura 31b) no se observa ningún tipo de cambio en la movilidad electroforética de TMEM59-HA en presencia de SopF. Estos resultados sugieren que SopF no ribosila a TMEM59.

Para comprobar si SopF pudiese ribosilar ATG16L1 en su dominio WD e inactivar así su función, se realizaron experimentos de co-transfección en células 293T en los que se sometieron varias construcciones de diferente peso molecular del dominio WD de ATG16L1 (N320-607 Y V230-607) a la acción de SopF con el fin de comparar en ausencia o presencia de esta proteína bacteriana algún tipo de movilidad electroforética mediante Western Blot.

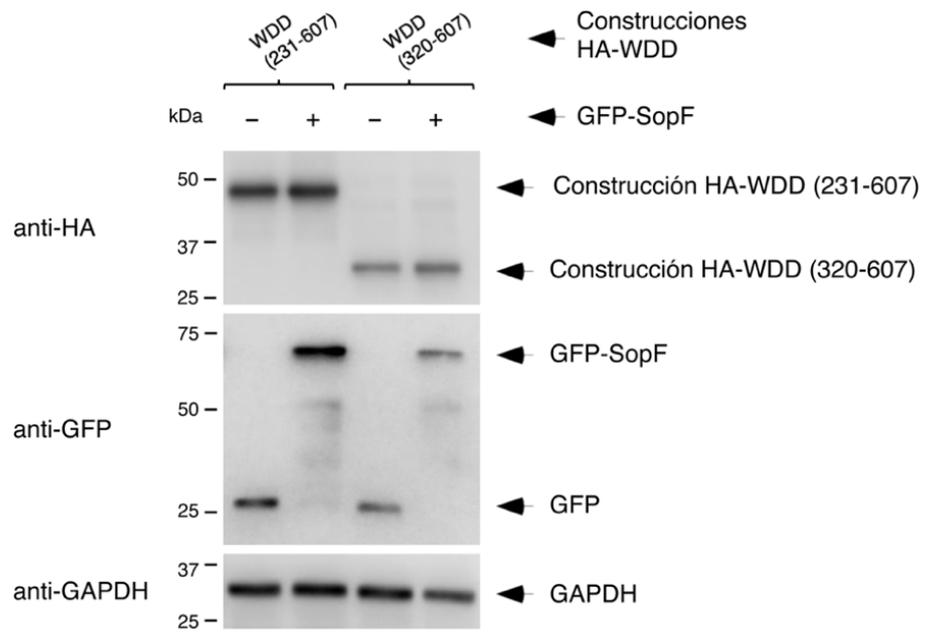


Figura 32. La proteína bacteriana SopF no muestra ningún tipo de shift en los dos dominios del WD de ATG6L1. Células HEK-293T fueron co-transfectadas con las diferentes construcciones del dominio WD (HA-WDD (231-607) y HA-WDD (320-607)) en ausencia o presencia de SopF (GFP-SopF). 36 horas post-transfección, las células fueron lisadas y las muestras procesadas mediante Western Blot con los anticuerpos indicados.

Los resultados muestran que no existe ningún tipo de cambio de movilidad electroforética (*shift*) en ninguna de las dos construcciones elegidas (Figura 32), sugiriendo que el dominio WD no es diana de la actividad de ribosilación de SopF, lo que podría querer decir que no existe ribosilación del dominio WDD. Aunque es cierto que, en el caso de que hubiese algún indicio de que esto ocurriese, podrían realizarse ensayos más exhaustivos para comprobarlo.

2.6. IMPACTO DE SopF EN LA INTERACCIÓN ATG16L1-TMEM59

Ya que SopF es capaz de inactivar por completo la lipidación de LC3-II inducida por la sobreexpresión de TMEM59 y considerando que la asociación entre TMEM59 y ATG16L1 es necesaria para que TMEM59 lipide LC3, se hipotetizó sobre la posibilidad de que SopF fuese capaz de inhibir la interacción entre este y ATG16L1 (asociación necesaria para lipidar LC3).

Para evaluar esta posibilidad, se realizaron experimentos de co-immunoprecipitación entre ATG16L1 y TMEM59 en ausencia o presencia de SopF.

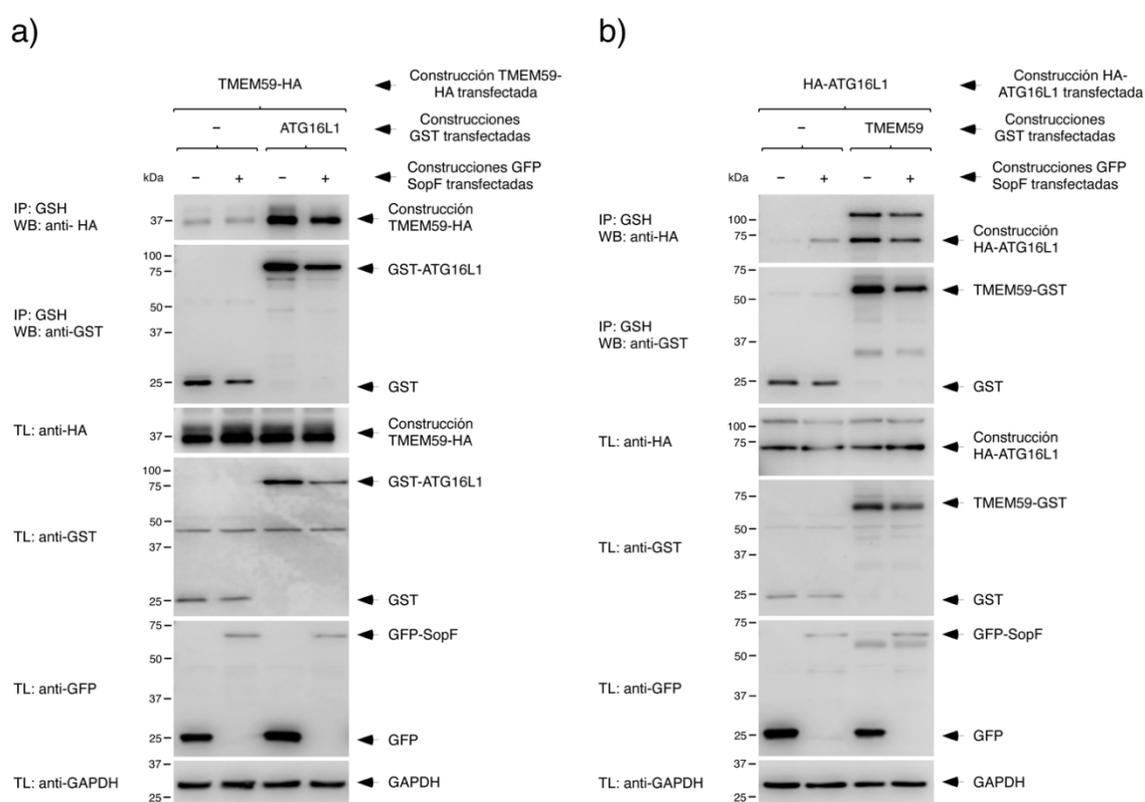


Figura 33. SopF no altera la interacción entre ATG16L1 y TMEM59. **a)** Células HEK-293T fueron co-transfectadas con GST-ATG16L1 y TMEM59-HA en ausencia o presencia de SopF (GFP-SopF). **b)** Células HEK-293T fueron co-transfectadas con HA-ATG16L1 y TMEM59-GST en ausencia o presencia de SopF (GFP-SopF). 36 horas post-transfección, las células fueron lisadas y las muestras procesadas mediante Western Blot con los anticuerpos indicados.

Estos ensayos indican que la unión de ATG16L1 y TMEM59 es insensible a SopF, ya que no se ve alterada en presencia de éste (GFP-SopF) en ninguna de las dos modalidades de inmunoprecipitación (Figura 33a y 33b).

Aunque todo apunta a que la función de TMEM59 en algún momento de su ruta converge con la v-ATPasa, el hecho de que la presencia de SopF no altere en ninguna medida la interacción de ATG16L1 y TMEM59 indica que esta unión se produciría aguas arriba ("*upstream*") de donde actúa SopF. En otras palabras, la unión de TMEM59 a ATG16L1 se produce antes de que ATG16L1 y la v-ATPasa converjan funcionalmente.

3. ASOCIACIÓN DE TMEM59 CON EL FRAGMENTO TRANSMEMBRANA (V₀) DE LA v-ATPasa

3.1. INTERACCIÓN DE TMEM59 CON LA SUBUNIDAD V_{0c} DE LA v-ATPasa

Datos previos confirmaron una interacción directa entre ATG16L1 y la v-ATPasa²¹², un posible modelo que tenga en cuenta todos los datos sería que exista una interacción indirecta entre TMEM59 y la v-ATPasa mediada por ATG16L1. Sin embargo, sorprendentemente, durante ensayos de co-inmunoprecipitación destinados a evaluar esta posibilidad se observó una fuerte asociación entre TMEM59 y la subunidad V_{0c}, precisamente la que es ribosilada por SopF (Figura 34). Estos resultados demuestran que la subunidad V_{0c}, y por extensión, la v-ATPasa, es un nuevo interactor de TMEM59.

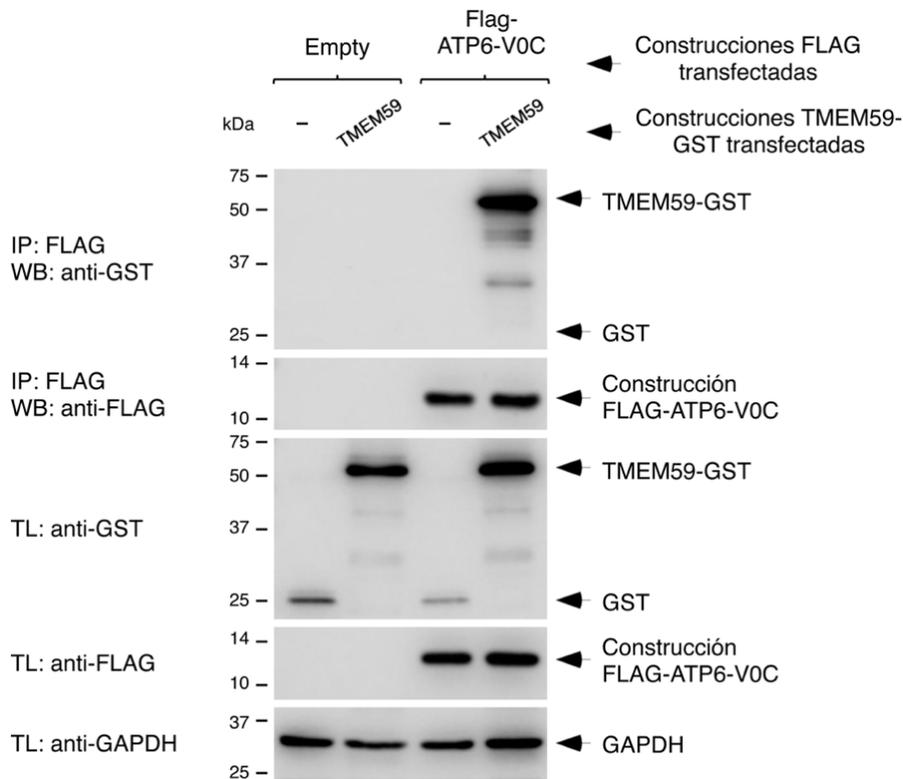


Figura 34. TMEM59 interacciona con la subunidad V_{0c} de la v-ATPasa. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con FLAG-ATP6-V0C o un vector vacío enfrentados a TMEM59 etiquetado con GST. Se utilizó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando matriz de agarosa fusionadas a proteína G (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

3.2. LA INTERACCIÓN TMEM59/ATP6- V_{0c} ES INSENSIBLE A SopF

Debido a la acción negativa que ejerce SopF sobre la actividad tanto de TMEM59 (bloqueando la lipidación de LC3-II) como de la V_{0c} (ribosilando la glutamina 124), se pensó que quizás SopF pudiese tener algún efecto negativo en la interacción entre TMEM59 y V_{0c} . Para evaluar esta posibilidad, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre TMEM59 (TMEM59-GST) y V_{0c} (FLAG-ATP6- V_{0c}) en ausencia o presencia de SopF.

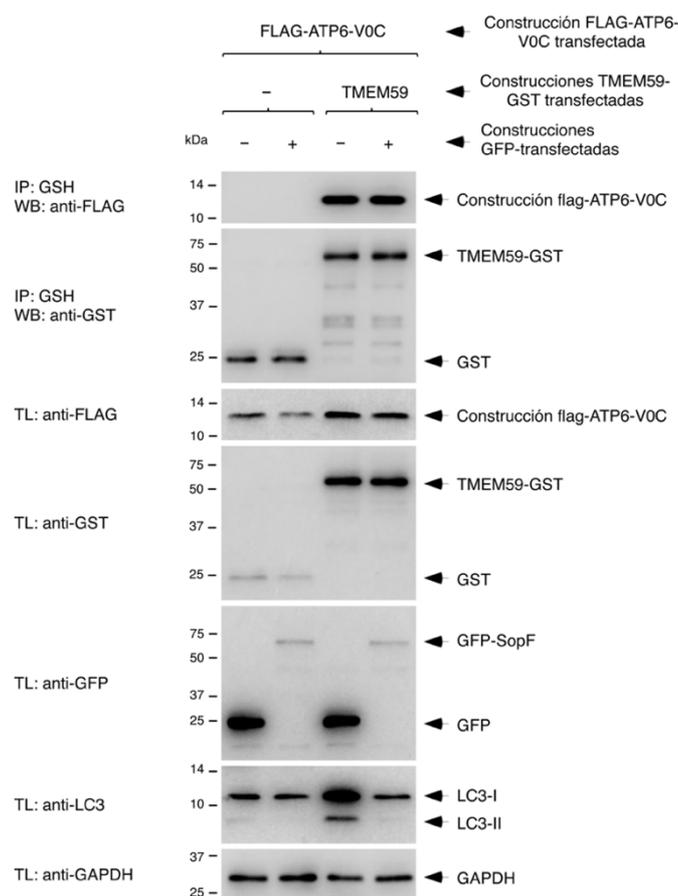


Figura 35. La interacción entre TMEM59 y la subunidad V_{0c} de la v-ATPasa no es sensible a SopF. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con FLAG-ATP6-V0C enfrentada a TMEM59 etiquetado con GST. Se usó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Los resultados de este ensayo muestran que SopF es incapaz de alterar la interacción entre TMEM59 y la subunidad V_{0c}, a pesar de que SopF sea capaz de inhibir la actividad de cada una de estas proteínas por separado. Esto sugiere que TMEM59 y V_{0c} interactúan de manera SopF independiente (Figura 35). Estos datos sugieren también que el residuo Q124 de la V_{0c} no está involucrado en la interacción con TMEM59, ya que este residuo estaría presumiblemente ribosilado debido a la acción de SopF (y por tanto inactivado) y a pesar de ello la interacción se conserva.

3.3. LA REGIÓN INTRACELULAR DE TMEM59 NO MEDIA LA ASOCIACIÓN CON LA V_0c

A continuación, se decidió analizar cuál es la región de TMEM59 responsable de la asociación con la subunidad V_0c . Ésta es una proteína transmembrana que contiene cuatro hélices transmembrana conectadas por dos pequeños codos citoplásmicos (en el segundo encontramos el residuo Q124) y otros tres luminales (Figura 36).

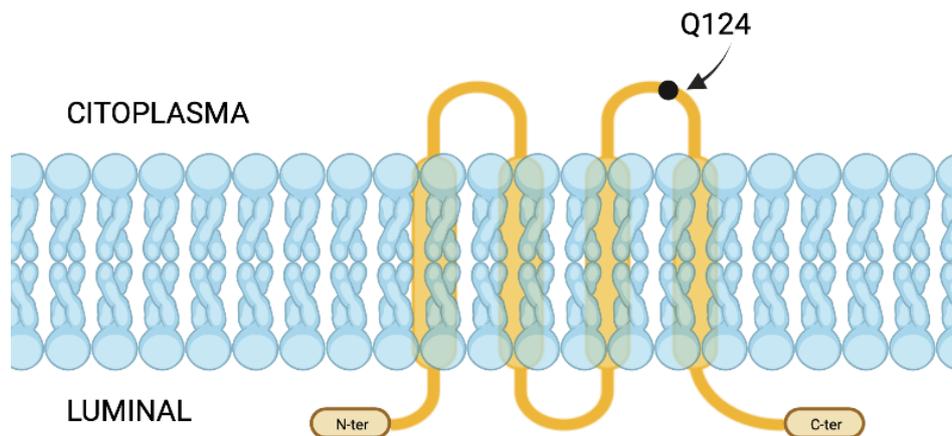


Figura 36. Detalle de la subunidad V_0c de la *v*-ATPasa. Proteína transmembrana multi-spanning con tres regiones luminales, cuatro hélices transmembrana y dos módulos citoplásmicos. En uno de estos últimos encontramos el residuo Q124 sensible de ribosilación

Se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con el objetivo de analizar si la región intracelular de TMEM59 media la interacción con la subunidad V_0c . En estos experimentos se analizaron dos deleciones del dominio intracelular: $\Delta 282$ y ΔID . Mientras que la primera de ellas ($\Delta 282$) corta la región intracelular justo en el punto donde acaba el motivo pro autofágico necesario para la asociación ATG16L1, la segunda (ΔID) carece completamente del dominio intracelular. Como control, se utilizó la versión WT de TMEM59. Además, se añadió el mutante 4M que inactiva los aminoácidos críticos del motivo interactivo de ATG16L1 y, por tanto, es

defectivo en su asociación a ATG16L1 (previamente explicado, véase *Introducción apartado 4. Autofagia no canónica*).

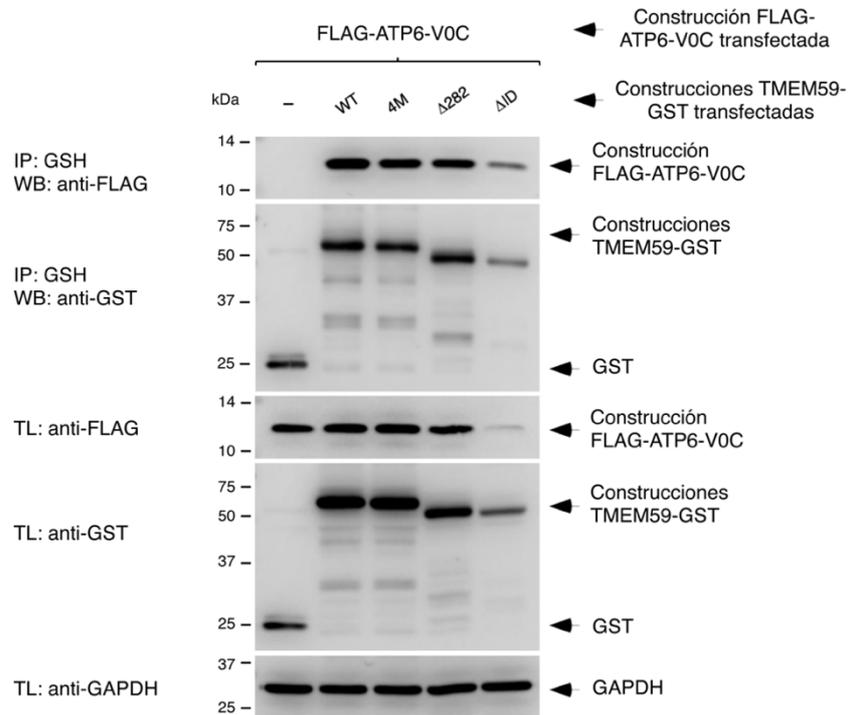


Figura 37. La región intracelular de TMEM59 no media la interacción con la V_{0c} . Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con FLAG-ATP6-V0C enfrentada a las diferentes construcciones de TMEM59 (TMEM-WT, TMEM-4M, TMEM- Δ 282 y TMEM- Δ ID) taguados todos con GST. Se usó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Los resultados obtenidos muestran que la región intracelular de TMEM59 no es la responsable de la unión a la V_{0c} , ya que incluso la construcción carente del dominio intracelular completo (Δ ID) une consistentemente esta subunidad de la v-ATPasa. Esto ocurre incluso a pesar de que sus niveles de expresión son mucho más bajos que el resto de las construcciones (Figura 37). Esta expresión tan pobre la encontramos a lo largo de todos los experimentos en los que utilizamos la construcción Δ ID. En la discusión (véase *Discusión*), debatiremos

sobre las posibilidades que podrían estar detrás de estos niveles de expresión tan bajos.

Al descartar tanto el motivo de unión a ATG16L1 (evaluado a partir del mutante 4M) como la región intracelular de TMEM59 como dominios interactores de la V_{0c} (y por tanto los dos fragmentos citosólicos de esta subunidad también), implícitamente se descarta también que ATG16L1, proteína encargada de la lipidación de LC3 medie esta unión. Lo que sugiere la idea de que esta interacción entre la V_{0c} y TMEM59 pudiese tener otro cometido que no sea la autofagia no canónica.

3.4. QUIMERAS DE TMEM59 SUGIEREN QUE LA REGIÓN TRANSMEMBRANA PODRÍA ESTAR INVOLUCRADA EN LA UNIÓN DE TMEM59 Y V_{0c}

Una vez confirmado que la región intracelular de TMEM59 no es la encargada de unirse a la V_{0c} , el siguiente paso fue investigar si los dominios transmembrana o extracelular estaban implicados en dicha asociación. Con el fin de evaluar esta teoría, se generaron una serie de construcciones quiméricas en las que los dominios extracelular y transmembrana de TMEM59 fueron intercambiados por las moléculas CD16 y CD7, respectivamente. Se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación a la V_{0c} con las diferentes quimeras con el fin de segregar la región extracelular y la región transmembrana la una de la otra para poder precisar cuál de las dos asume la actividad interactora con la V_{0c} . Las construcciones finales se denominaron Ch1, Ch2 y Ch3, siendo la Ch1 la quimera control (CD16-CD7-GST). Esta quimera no contiene ningún fragmento de la proteína TMEM59. La Ch2 contiene aislado el dominio transmembrana de TMEM59 y por tanto poseerá el dominio extracelular de CD16 (CD16-AIR TM-GST). Por último,

la Ch3 contiene el extracelular de TMEM59 y por consiguiente posee el dominio transmembrana de CD7 (AIR ED-CD7-GST) (Figura 38a).

a)

NOMBRE DE LAS QUIMERAS	REGION EXTRACELULAR	REGION TRANSMEMBRANA	TAG
Ch1	CD16	CD7	GST
Ch2	CD16	TMEM59	GST
Ch3	TMEM59	CD7	GST

b)

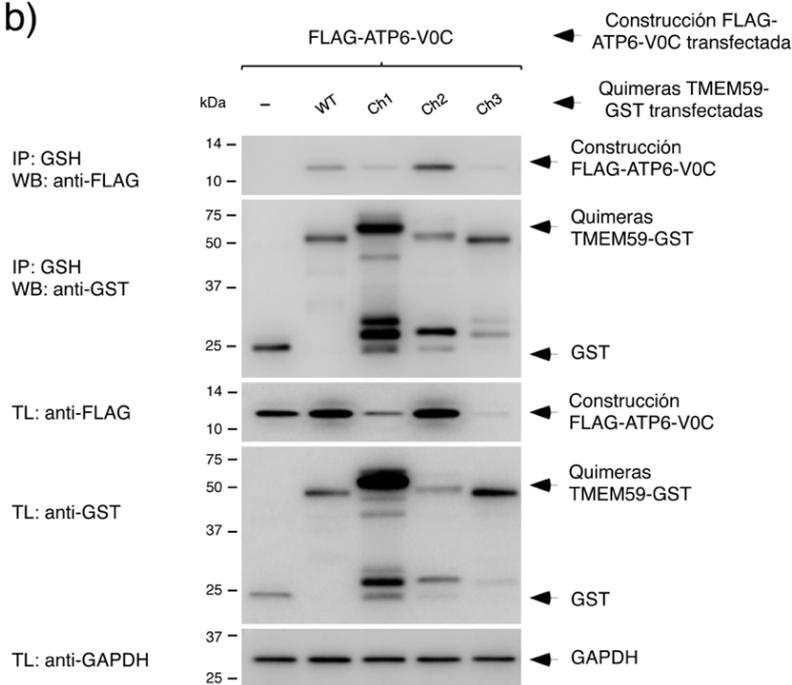


Figura 38. Las quimeras de TMEM59 sugieren la idea de que el dominio transmembrana podría ser el responsable de la asociación con la V_{0c} . a) Tabla resumen de las diferentes quimeras generadas (Ch1, Ch2 y Ch3). La Ch1 es la quimera control (CD16-CD7-GST). La Ch2 es la que contiene aislado el dominio transmembrana de TMEM59 (CD16-AIR TM-GST). La Ch3 contiene aislado el extracelular de TMEM59 (AIR ED-CD7-GST). b) Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con FLAG-ATP6-V0C enfrentada tanto a TMEM59-WT como a las diferentes quimeras de este (Ch1, Ch2 y Ch3) taguados todos con GST. Se usó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

subunidad V_{0c} en los diferentes puntos experimentales. Así, a pesar de que el panel de la IP muestra una clara asociación de la V_{0c} (FLAG-ATP6- V_{0c}) con la quimera dos (CD16-AIR TM-GST) (Figura 38) con respecto al resto de quimeras, en este punto los niveles de la V_{0c} son claramente superiores con respecto al resto de carriles (lisado total de la Figura 38).

De hecho, eligiendo la primera condición (primer carril en el que FLAG-ATP6- V_{0c} se co-transfecta con un vector vacío) como expresión basal, se observa que cuando la V_{0c} (FLAG-ATP6- V_{0c}) es co-transfectada con la versión WT de TMEM59 y la Ch2 (ambas contenedoras de la transmembrana de TMEM59), la V_{0c} aumenta sus niveles de expresión con respecto al control. Por otro lado, cuando la V_{0c} (FLAG-ATP6- V_{0c}) es co-transfectada con la quimera Ch1 y Ch3 (ambas carentes del dominio transmembrana de TMEM59), la expresión de la subunidad V_{0c} (FLAG-ATP6- V_{0c}) se reduce con respecto al control.

Dado que la mezcla de transfección de los diferentes ensayos provino de una mezcla inicial en la que se puso una cantidad constante del plásmido que expresa la subunidad V_{0c} (p12-FLAG-ATP6- V_{0c}), la razón por la que puede ocurrir este fenómeno resulta difícil de explicar. En todo caso, estos resultados sugieren la existencia de una posible relación funcional entre ambas moléculas en la que el dominio transmembrana de TMEM59 tendría la capacidad de estabilizar o de alguna manera favorecer la expresión de la V_{0c} . A pesar de que los resultados no son totalmente concluyentes, se considera que la opción más plausible es que esta relación funcional entre la subunidad V_{0c} y TMEM59 sea una consecuencia de una interacción física entre las regiones transmembrana de ambas moléculas.

3.5. UN POSIBLE COMPLEJO TRIPLE ATG16L1/TMEM59/ATP6-V₀C

Anteriormente se ha discutido la posibilidad de que la interacción entre V₀c y TMEM59 no estuviese implicada en la capacidad de TMEM59 para inducir autofagia no canónica (véase apartado 3.2. *La región intracelular de TMEM59 no media la asociación entre este y la V₀c*), ya que la versión 4M de TMEM59 no ve alterada su interacción con la V₀c (Figura 37). Sin embargo, dado que ambas proteínas (ATG16L1 y V₀c) se unen a TMEM59 a través de regiones distintas, existiría la posibilidad de que ambas se asociasen simultáneamente a éste formando un complejo triple. Para intentar analizar esta teoría, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación poniendo como eje central a TMEM59 (TMEM59-GST), con el que se co-transfectó ATG16L1 (HA-ATG16L1), V₀c (FLAG-ATP6-V₀c) o ambas a la vez con el fin de observar la existencia de una posible competición o sinergia. Además, este ensayo se realizó en dos condiciones: en ausencia o presencia de monensina, con el fin de evaluar la posibilidad de que la formación de este complejo se vea favorecida en condiciones de inducción de la ruta no canónica.

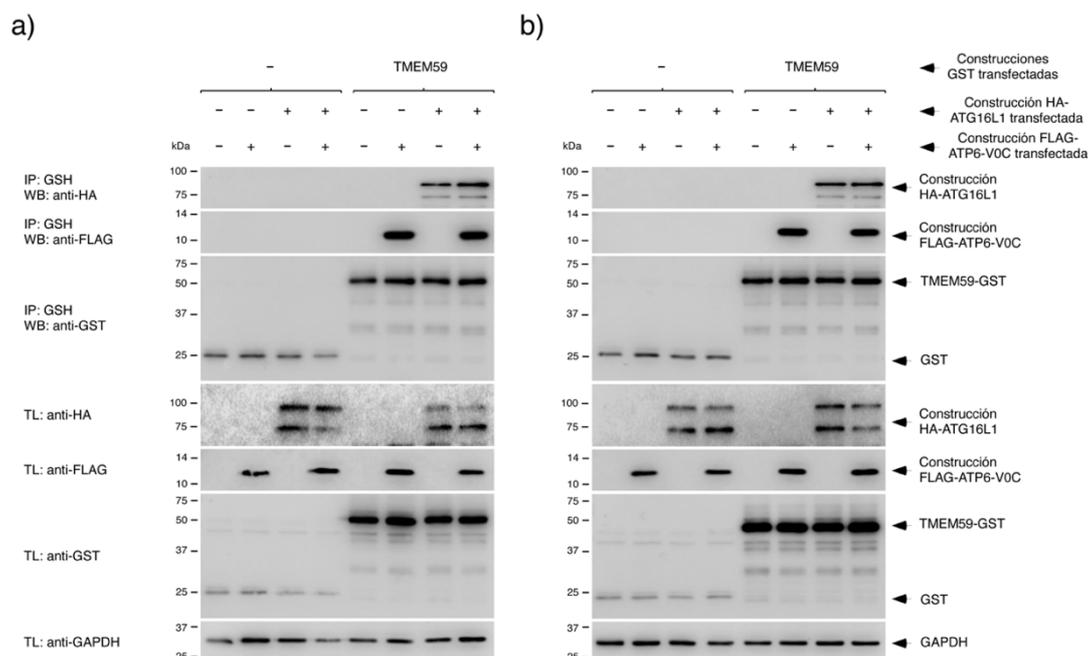


Figura 39. Los ensayos de triple co-inmunoprecipitación no descartan la posibilidad de la existencia de un complejo triple entre TMEM59/ATG16L1/ATP6-V₀C. **a)** Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con FLAG-ATP6-V₀C, HA-ATG16L1 o ambas a la vez. Todas enfrentadas tanto a TMEM59-WT etiquetado con GST. Todas ellas se sometieron también a un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados. **b)** Esta condición es igual que la anterior, salvo que se trató previamente con monensina 100 μ M durante 1 hora como estímulo para activar la autofagia no canónica.

Los resultados de estas co-inmunoprecipitaciones indican que la cantidad de ATG16L1 presente en los precipitados de TMEM59-GST (IP de la Figura 39) es la misma haya o no haya co-expresión de la V₀C o tratamiento con monensina (Figura 39). Aunque es difícil descartar completamente que ATG16L1 y V₀C se puedan unir a diferentes poblaciones de TMEM59, estos datos son consistentes con la posibilidad de que ambos (ATG16L1 y V₀C) sean capaces de unirse simultáneamente a TMEM59 formando un complejo triple. No obstante, ante la ausencia de un estímulo que desencadene la formación de este posible complejo con el que poder comparar las condiciones pre- y post-estímulo, esta idea simplemente quedaría abierta para su posible futura validación.

4. ASOCIACIÓN DE TMEM59 CON EL FRAGMENTO CITOSÓLICO (V₁) DE LA v-ATPasa

4.1. LA UNIÓN TMEM59-V₁A NO PARECE NECESITAR EL FRAGMENTO TRANSMEMBRANA (V₀)

Está descrito en la literatura que la actividad de la v-ATPasa se regula a través de la asociación controlada entre el fragmento transmembrana V₀ que se encuentra en las membranas lisosomales, y el fragmento citosólico V₁ que sólo se transloca y se ensambla a la V₀ en presencia de un estímulo. Dado que TMEM59 interacciona con la subunidad V_{0c} de la v-ATPasa (véase apartado 2.1. *Interacción de TMEM59 con la subunidad V_{0c} de la v-ATPasa*) y con ATG16L1, que a su vez interacciona con la subunidad V₁A, existe la posibilidad de que TMEM59 sea capaz de, directa o indirectamente, activar la subunidad catalítica V₁. Para evaluar esta posibilidad, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación entre TMEM59-GST y la subunidad V₁A, cuyo nivel de expresión se analizó previamente (Figura 30a), en ausencia o presencia de monensina para inducir disfunción lisosomal, activación de la actividad v-ATPasa y por tanto ensamblaje de las porciones V₀ y V₁.

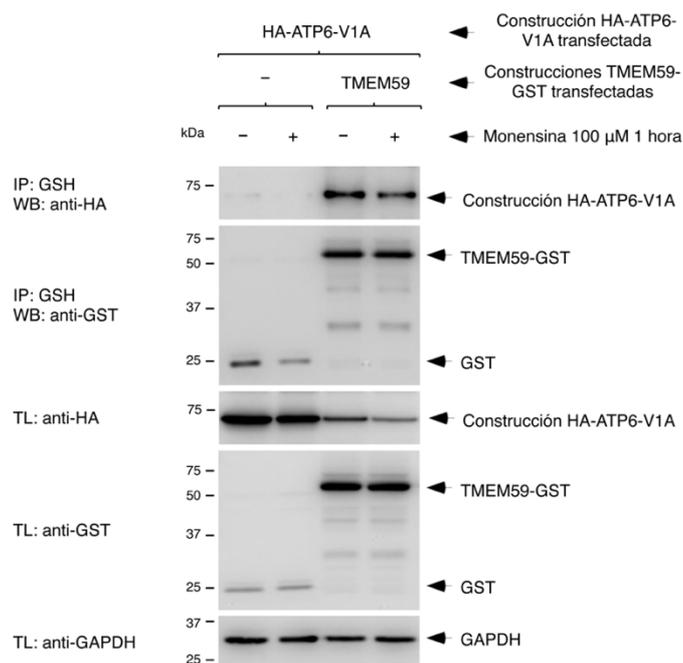


Figura 40. TMEM59 y V₁A interaccionan de manera monensina independiente. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con HA-ATP6-V₁A enfrentada a TMEM59 etiquetado con GST. Se utilizó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Los resultados obtenidos indican que también hay una fuerte interacción entre la subunidad citosólica V₁A y TMEM59 (Figura 40). Sorprendentemente, esta unión no es monensina dependiente, lo que indica que no es necesaria la previa activación de la v-ATPasa para que la V₁A y TMEM59 se vinculen. Esto último, sugiere implícitamente tanto que la porción transmembrana V₀ no sería necesaria para esta nueva interacción como que TMEM59 probablemente es capaz de unirse a ambas porciones de la v-ATPasa de manera independiente una de la otra.

4.2. EL MOTIVO DE UNIÓN A ATG16L1 NO MEDIA LA INTERACCIÓN CON LA SUBUNIDAD V₁A

Como en el caso de la V_{0c}, se estudió cuál es la región de TMEM59 encargada de la unión con la V₁A. Asumiendo que dicha asociación es directa (es decir, que no hay proteínas intermedias que hagan de puente), inicialmente se descartaron la región extracelular y la región transmembrana. La implicación de cualquiera de los dos dominios anteriores sería difícil de concebir ya que la V₁A es una subunidad completamente citosólica. Tanto el dominio extracelular como la transmembrana de TMEM59 se encuentran inaccesibles al citoplasma, lugar donde se encuentra la V₁A.

Por ello, se decidió analizar la implicación del dominio intracelular de TMEM59 en la interacción con la subunidad V₁A, utilizando las mismas deleciones empleadas para estudiar la unión de TMEM59 con la subunidad V₀c (Figura 37).

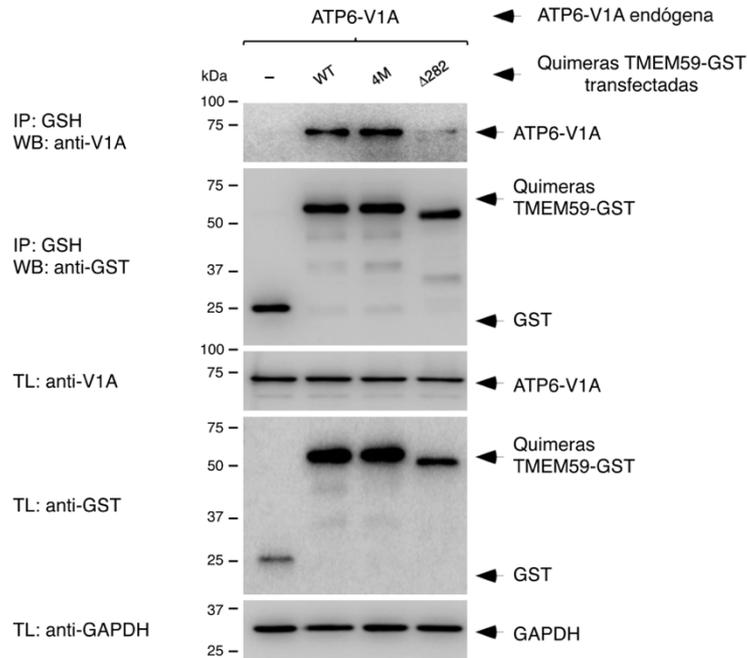


Figura 41. TMEM59 interacciona con la subunidad V₁A a partir del aminoácido 282. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con HA-ATP6-V₁A. enfrentada a las distintas construcciones de TMEM59 (TMEM-WT, TMEM-4M y TMEM-Δ282, taguados todos con GST. Se utilizó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Los resultados obtenidos de este experimento muestran que la asociación entre la V₁A y TMEM59 no se ve afectada por la mutación en los residuos críticos del motivo pro-autofágico, esenciales para su interacción con ATG16L1 (TMEM59-4M) (Figura 41). Por otro lado, la asociación entre la V₁A y TMEM59 se ve afectada por la deleción de los residuos a partir del 282 (TMEM-Δ282-GST)

(Figura 41), esta construcción en cambio retiene la capacidad de unión a la V_{0c} debido a que contiene el dominio transmembrana (Figura 37).

Estos resultados sugieren que la unión de TMEM59 a la subunidad V_{1A} es directa, puesto que es independiente de que TMEM59 interaccione con ATG16L1 (demostrado con el mutante 4M) o con la subunidad V_{0c} (demostrado con el $\Delta 282$). Así, la región interactora de TMEM59 con la V_{1A} se encontraría por tanto entre los residuos 282 y 323. Debido a que los aminoácidos 282 y 283 (los primeros de esta supuesta región interactora) son fenilalanina (F) y metionina (M), a este fragmento lo denominaremos a partir de ahora como región FM.

4.3. EL FRAGMENTO FM (282-323) ES SUFICIENTE PARA QUE SE PRODUZCA LA UNIÓN ENTRE TMEM59 Y ATP6- V_{1A}

Una vez demostrado que la subunidad V_{1A} deja de unirse a TMEM59 en ausencia del fragmento comprendido entre los aminoácidos 282 y 323 (fragmento FM). Se decidió analizar si éste también resulta suficiente para la interacción. Para ello se generó una construcción de TMEM59-GST con los dominios extracelular y transmembrana intactos, pero a cuya región intracelular se le delecionó toda la región del motivo pro-autofágico (desde el inicio del dominio intracelular hasta el aminoácido 282). Por tanto, esta construcción sería incapaz de interaccionar con ATG16L1, y el único fragmento intracelular presente en ella sería el fragmento FM (residuos 282 al 323). A esta construcción se la denominó TMEM59- $\Delta(260-282)$ -FM-GST.

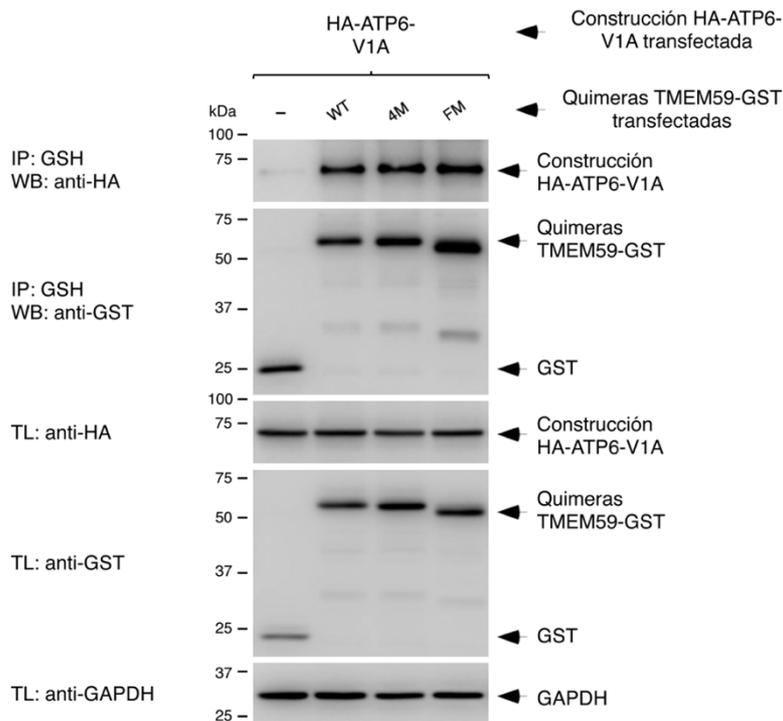


Figura 42. El fragmento FM (282-323) retiene toda la capacidad de unión a la V₁A de TMEM59-WT. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con HA-ATP6-V₁A enfrentada a las distintas construcciones de TMEM59 (TMEM-WT, TMEM-4M y TMEM- Δ (260-282)-FM (nombrado FM), tagueados todos con GST. Se utilizó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando una matriz de agarosa fusionada a GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Utilizando como control la interacción entre el TMEM59 "full length" y la V₁A, se observó que la mutación 4M de TMEM59, al igual que en la Figura 37, no altera la asociación de éste a la subunidad V₁A. Esto vuelve a reforzar la idea de que la interacción entre TMEM59 y la V₁A es independiente del motivo pro-autofágico y, por tanto, independiente de ATG16L1. También se aprecia cómo la construcción TMEM59- Δ (260-282)-FM-GST retiene la capacidad de interacción con la V₁A que la molécula de TMEM59 completa, sugiriendo que no existen otras regiones de TMEM59 además del fragmento FM (282-323) involucradas en la unión con la subunidad V₁A.

4.4. EL DOMINIO DE UNIÓN A LA SUBUNIDAD V₁A ESTÁ INCLUIDO ENTRE LOS RESIDUOS R290 Y I323 DE TMEM59

Para confirmar este resultado y definir más detalladamente la región interactora de TMEM59 con la V₁A, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación utilizando deleciones seriadas de la región intracelular de TMEM59 con el fin de intentar acotar más la región de interacción de TMEM59. En este caso, la co-inmunoprecipitación se realizó con un anticuerpo anti-TMEM59 que reconoce la región extracelular (N-terminal) de este.

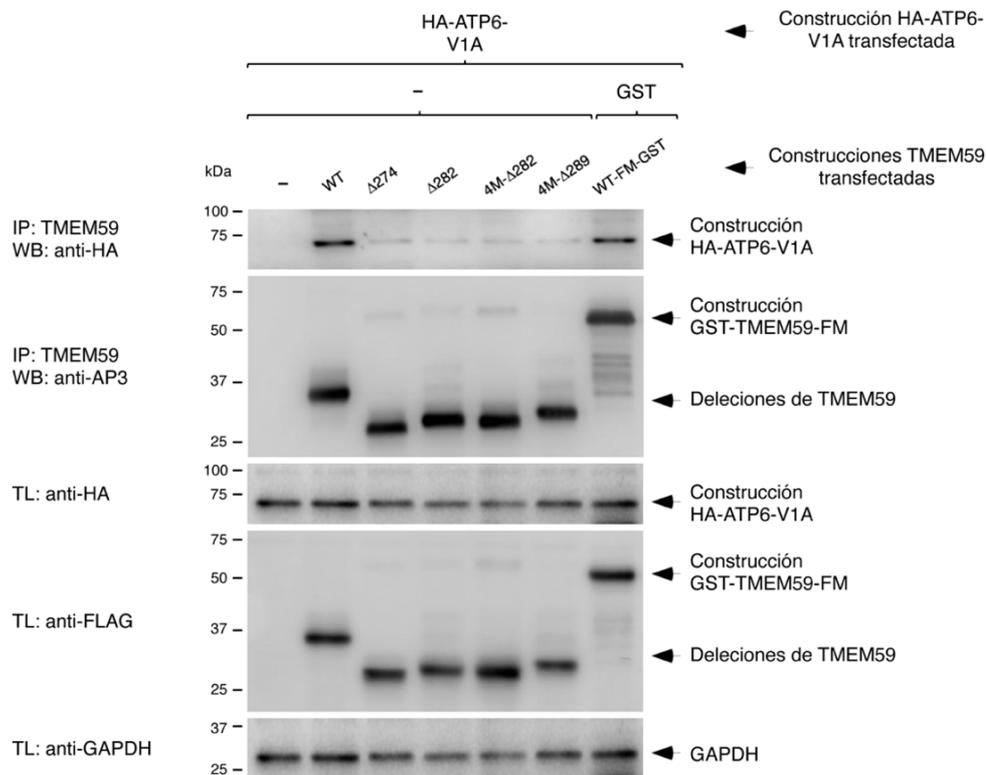


Figura 43. La región interactora de TMEM59 con la V₁A comprende desde el R290 hasta la I323. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con HA-ATP6-V₁A enfrentada a las distintas deleciones de TMEM59 ($\Delta 274$, $\Delta 282$, $\Delta 282-4M$, $\Delta 289$) y a TMEM- $\Delta(260-282)$ -FM-GST (nombrado FM) todos sin etiquetar salvo el último. Se utilizó un vector vacío (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando matriz de agarosa fusionadas a proteína G (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Utilizando como control la interacción entre el TMEM59 “full length” y la subunidad V₁A, se puede apreciar con claridad que ningún mutante consigue sostener la interacción con la V₁A excepto la construcción que contiene el fragmento FM (282-323) (Figura 43). Dado que la delección Δ 289 tampoco es capaz de interactuar con la V₁A, se puede inferir que no todo el fragmento FM une, sino que la posible región interactora se delimitaría más y estaría comprendida entre los aminoácidos R290 e I323.

Es cierto que la única construcción que mantiene la interacción con la V₁A es también la única construcción que posee un tag (GST). Dado que en este ensayo no se incluyó un punto control con GST sólo, la señal positiva observada en el punto experimental que contiene el fragmento FM podría derivar de una interacción irrelevante con la fracción GST en lugar de con TMEM59. Sin embargo, diferentes experimentos previos indican que GST por sí mismo es incapaz de interactuar con V₁A (ver puntos control con GST en las figuras 37, 41 y 42).

A pesar de esto, se realizó un último experimento en el que se sobreexpresaron las quimeras TMEM59-WT-GST y TMEM59- Δ (260-282)-FM-GST junto con un GST aislado como control. Estas construcciones se co-transfectaron con HA-ATP6-V₁A y se abordó la co-inmunoprecipitación con el anticuerpo anti-TMEM59. El resultado demuestra que HA-ATP6-V₁A co-precipita con la quimera FM, pero no con el control de GST (Figura 44), solidificando los resultados obtenidos en la figura 43.

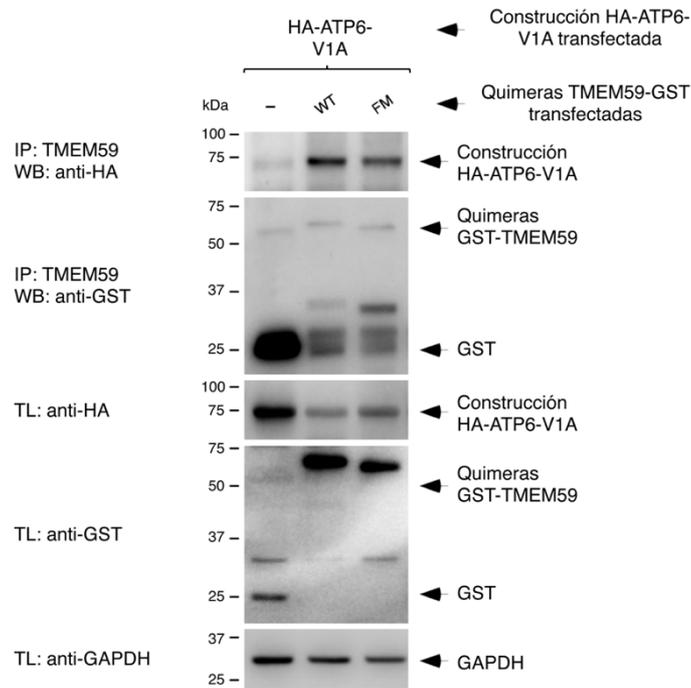


Figura 44. El tag GST no da fondo y la construcción FM sigue manteniendo toda la capacidad de unión a la V₁A del TMEM59. Células HEK-293-T fueron co-transfectadas con HA-ATP6-V₁A enfrentada a TMEM59-WT y a TMEM-Δ(260-282)-FM- (nombrado FM) ambos taguados con GST. Se utilizó un GST aislado (-) como control. 36 horas post-transfección, las células se lisaron y se sometieron a ensayos de co-inmunoprecipitación usando matriz de agarosa fusionadas a proteína G (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Por tanto, todos los resultados obtenidos apuntan a un modelo en el que TMEM59 cumpliría dos funciones segregadas. Por un lado, es capaz de inducir LC3 a través de la unión directa entre su motivo pro-autofágico y el dominio WD de ATG16L1 de una forma independiente de los residuos F467 y K490, pero de alguna manera dependiente de la v-ATPasa que actuaría downstream de esta interacción.

Por otro lado, esta actividad no parece estar relacionada con las nuevas interacciones analizadas en esta tesis de TMEM59 y la V₀c (probablemente a través del dominio transmembrana) o la V₁A (a través del dominio intracelular), cuyo papel fisiológico es actualmente desconocido.

CAPITULO 3. TMEM59 Y SU PAPEL EN
XENOFAGIA

1. INTRODUCCIÓN DE TMEM59 EN XENOFAGIA

Previos estudios en el laboratorio demostraron la intervención de TMEM59 ante la infección por *Staphylococcus aureus*¹⁸⁶. Concretamente, la depleción de TMEM59 bloquea la lipidación de LC3 producida por esta bacteria gram positiva en estados tempranos de la infección, lo que indica que la interacción ATG16L1-TMEM59 era necesaria para combatir la infección.

La muerte celular inducida por *S. aureus* a partir de las 16 horas post-infección fue un problema metodológico que dificultaba el estudio del papel de TMEM59 en xenofagia. Por ello, se decidió testar otra bacteria gram positiva que no indujese este fenómeno.

Dada la interacción directa de TMEM59 con ambos fragmentos de la ATPasa (previamente demostrada en el *Capítulo 2 de Resultados*), se buscó una bacteria gram positiva que interaccionase de alguna manera con la ATPasa. Así se eligió *Streptococcus pyogenes* como candidata. Esta bacteria gram positiva utiliza la maquinaria autofágica en su propio beneficio, ya que es capaz de replicarse en el interior de autofagosomas, inhibiendo su acidificación a partir del bloqueo de la ATPasa²⁸⁸.

2. TMEM59 EN RESPUESTA A INFECCIÓN POR *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

2.1. INDUCCIÓN DE TMEM59 EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *S. PYOGENES*

Con el objetivo de obtener una cinética detallada de los niveles de expresión de TMEM59 durante el proceso infectivo, MEFs WT fueron infectados con *S. pyogenes* a una multiplicidad de infección de 50 (MOI 50) (véase *Materiales y métodos* apartado 9.3 *Infección celular*). Se obtuvieron lisados celulares totales en los diferentes puntos temporales post-infección. Además, se realizaron dos

condiciones diferentes de crecimiento bacteriano: crecimiento estático y crecimiento en agitación (véase *Materiales y métodos* apartado 9.2. *Crecimiento bacteriano*)

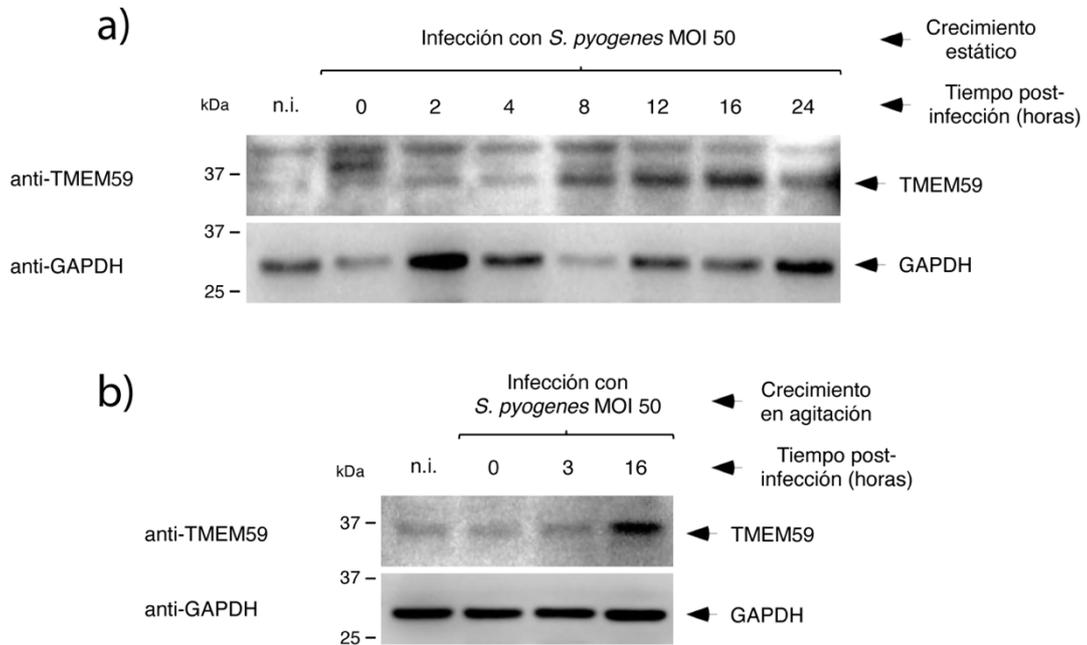


Figura 45. La infección por *S. pyogenes* induce la expresión de TMEM59 a partir de las 8 horas post-infección Los MEFs WT (+8) fueron infectados con *S. pyogenes* ($OD_{600}=0,85$) a MOI 50 en modalidad de crecimiento estático **(a)** o modalidad de crecimiento en agitación **(b)**. Se lisaron las células en los puntos temporales pertinentes mostrados en la figura. Tras obtener todos, las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados.

Los resultados muestran un incremento en los niveles de expresión de TMEM59 en respuesta a la infección por *S. pyogenes* a partir de las 8 horas que se mantienen hasta las 16 horas post-infección. Esto ocurre tanto en la modalidad de crecimiento en estático (Figura 45a) como en la modalidad de crecimiento en agitación (Figura 45b). Estos resultados sugieren que TMEM59 juega un papel activo en la infección por *S. pyogenes*.

2.2. TMEM59 CO-LOCALIZA CON *S. PYOGENES* Y LAMP1

A continuación, se analizó si TMEM59 pudiese ser reclutado al fagolisosoma bacteriano. Dado que otros estudios ya habían demostrado la encapsulación de *S. pyogenes* en vesículas LAMP1 positivas²⁸⁹, en este contexto se decidió analizar si estas vesículas pudiesen ser también TMEM59 positivas. Para ello se emplearon las células que co-expresan simultáneamente de manera estable tanto LAMP1-GFP como TMEM59-WT-mRFP.

Ya que las inducciones de TMEM59 analizadas por Western Blot resultaron más sólidas cuando la bacteria fue crecida en agitación, se utilizó esta modalidad de crecimiento para estos experimentos.

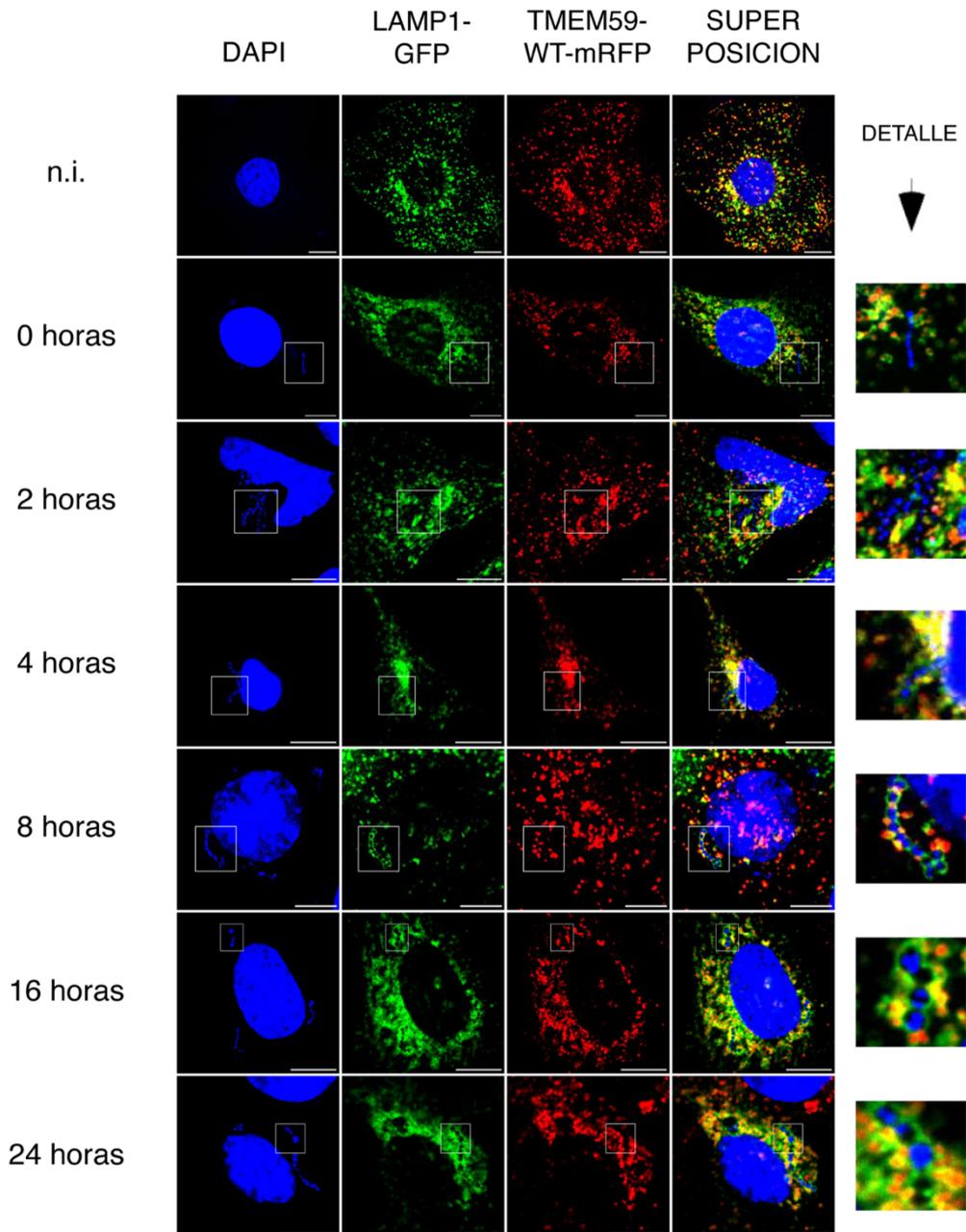


Figura 46. Ensayos de infección en MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP (-8) revelan una fuerte co-localización de TMEM59 con las estructuras LAMP1 positivas que rodean a la bacteria. Los MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP + LAMP1-GFP fueron infectados con *S. pyogenes* ($OD_{600}=0,85$) a MOI 50 en modalidad de crecimiento en agitación. Al finalizar cada tiempo pertinente post-infección, las células se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI (1:10000), en verde se muestra LAMP1-GFP y en rojo se muestra TMEM59-mRFP. Las imágenes fueron elegidas como las representativas de los fenotipos observados. Todas las barras de escala representan 10 μm .

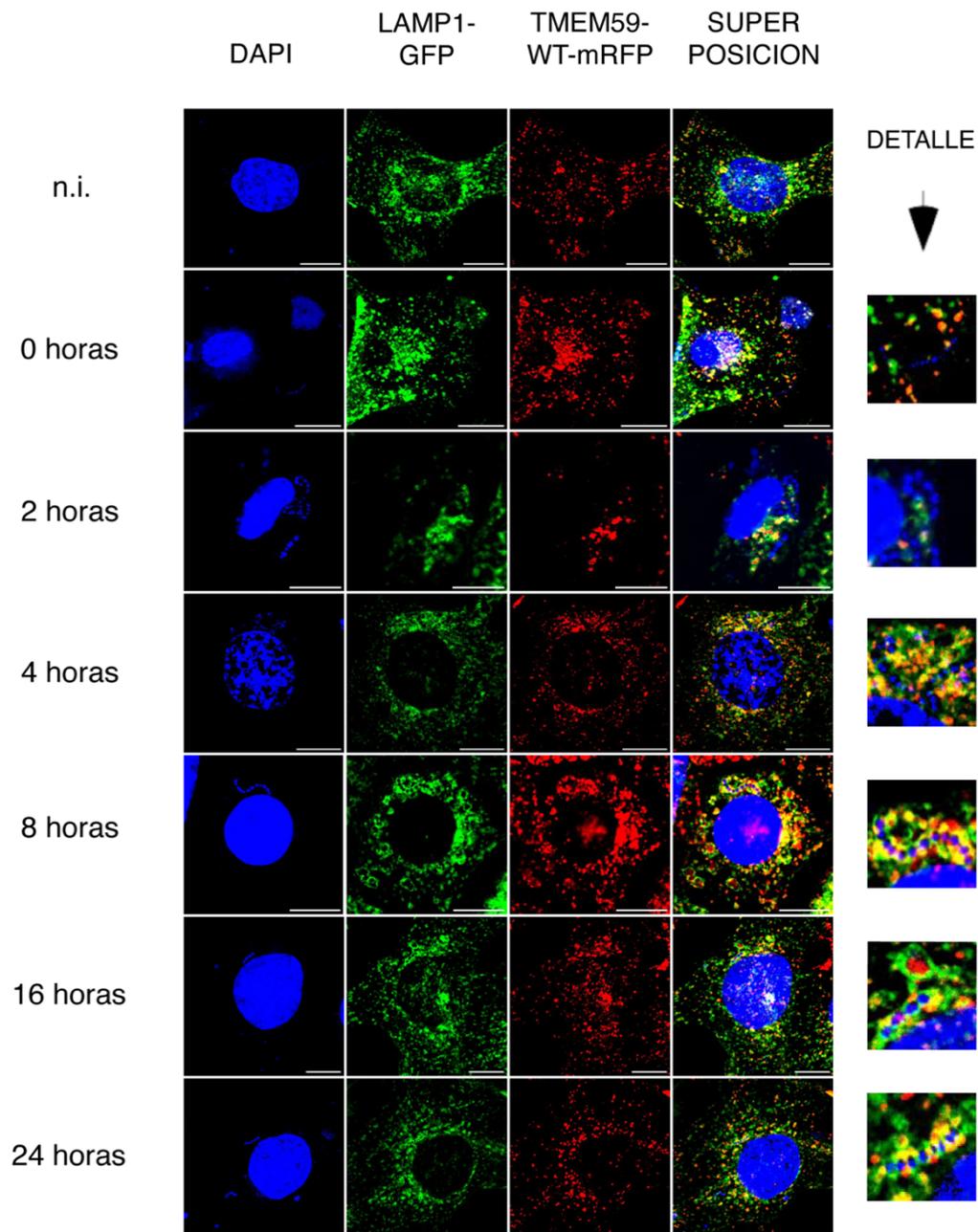


Figura 47. Ensayos de infección en MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP (+8) revelan una fuerte co-localización de TMEM59 con las estructuras LAMP1 positivas que rodean a la bacteria. Los MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-mRFP + LAMP1-GFP fueron infectados con *S. pyogenes* ($OD_{600}=0,85$) a MOI 50 en modalidad de crecimiento en agitación. Al finalizar cada tiempo pertinente post-infección, las células se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para inmunofluorescencia. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI (1:10000), en verde se muestra LAMP1-GFP y en rojo se muestra TMEM59-mRFP. Las imágenes fueron elegidas como las representativas de los fenotipos observados. Todas las barras de escala representan 10 μ m.

Los resultados obtenidos muestran una fuerte asociación de TMEM59 con las estructuras LAMP1 positivas que encapsulan las cadenas de *S. pyogenes* a partir de los puntos temporales de 4 y 8 horas hasta las 24 horas (Figura 46 y Figura 47). No obstante, se aprecia cómo las estructuras de ambas proteínas no son exactamente iguales. Por un lado, las estructuras formadas por LAMP1 forman cápsulas alrededor de cada coco o diplococo de *S. pyogenes*. Por el contrario, las estructuras formadas por TMEM59 son principalmente globulares y parecen asociarse a la parte externa de las estructuras de LAMP1, sobre todo en las regiones entre una cápsula y la siguiente. En la Figura 48 se muestra un resumen de todas las diferentes estructuras encontradas a lo largo de estos ensayos, aunque la diversidad

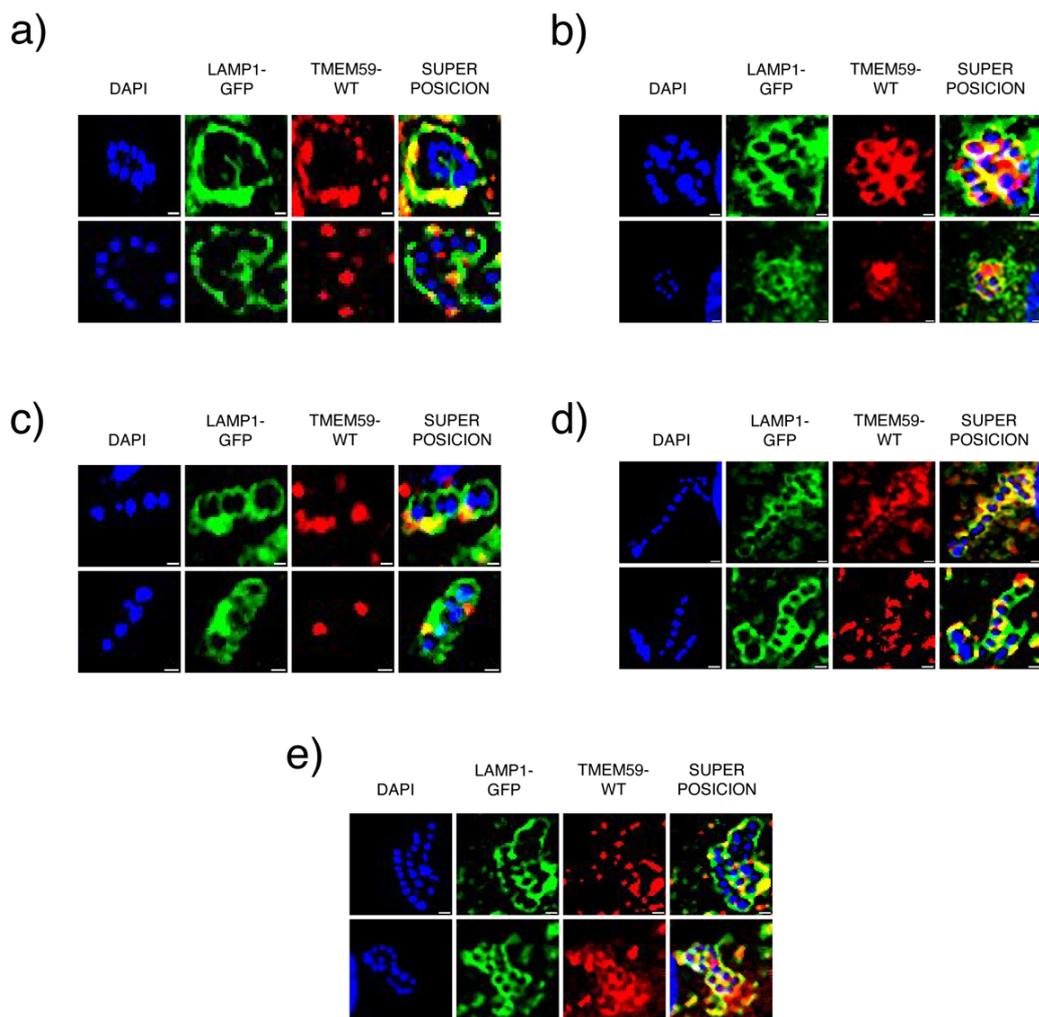


Figura 48. Diferentes tipos de estructuras formadas por LAMP1 y TMEM59 con *S. pyogenes*.

a) En estadios iniciales observamos estructuras LAMP1 positivas sin tabicar que engloban *grosso modo* cúmulos de bacterias. **b)** En estadios posteriores, esta estructura comienza a tabicarse y a encapsular cada uno de los monococos. **c)** Una vez tabicadas las estructuras LAMP1 positivas, se asocian estructuras vesiculares TMEM59 positivas a la cara externa de las cápsulas LAMP1 positivas. **d)** Se empiezan a tabicar las estructuras TMEM59 positivas asociadas hasta que se fusionan con las estructuras ya tabicadas de LAMP1 **(e)**. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI (1:10000), en verde se muestra LAMP1-GFP y en rojo se muestra TMEM59-mRFP. Las imágenes fueron elegidas como las representativas de los fenotipos observados. Todas las barras de escala representan 10 μm .

2.3. GENERACIÓN DE MEFs PARA ESTUDIOS DE INFECCIÓN MEDIANTE CITOMETRIA

El hecho de que TMEM59 sea reclutado a los fagolisosomas donde se encuentra *S. pyogenes* sugiere que podría tener un papel en la defensa contra la infección. Para explorar esta cuestión, se plantearon ensayos de infección con una versión modificada de la bacteria que expresa GFP de manera constitutiva con el fin de medir cambios sutiles mediante citometría de flujo en las diferentes líneas celulares. Con el fin de evitar interferencias entre la GFP de la bacteria y el fluoróforo mRFP con el que se recuperaron previamente las células (TMEM59-WT-mRFP), se generó otra estirpe de MEFs recuperados con un TMEM59 que estaba etiquetado con el tag HA a partir de los MEFs deficientes en TMEM59 (MEFs TMEM59 KO +8). Como ya se describió previamente, se realizaron dos infecciones retrovirales con diferentes diluciones del sobrenadante viral para evitar fenómenos de toxicidad por la sobreexpresión de TMEM59, así como para elegir las estirpes con la mínima diferencia posible en los niveles de expresión entre la versión WT y la versión 4M.

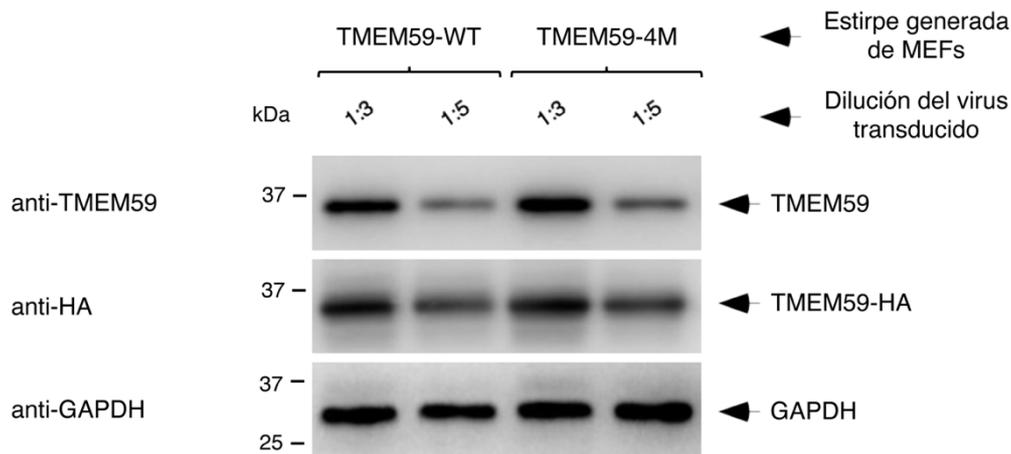


Figura 49. Los niveles de expresión de los MEFs recuperados con la versión WT y la versión 4M de TMEM59-HA son similares. Los MEFs TMEM59 KO (+8) fueron transducidas con la versión WT (TMEM59-WT-HA) y la versión 4M (TMEM59-4M-HA) de una construcción de TMEM59 etiquetada con HA en su extremo N-terminal. Tras una semana en selección con puromicina (1 μ g/ml), las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados para observar la recuperación de las estirpes celulares generadas.

En este caso, sin embargo, los niveles de expresión de TMEM59-WT-HA y TMEM59-4M-HA fueron similares (Figura 49). Para los ensayos de citometría se utilizaron las células generadas con la dilución de virus 1:5 con el fin de evitar los efectos tóxicos que pudiesen derivarse de la sobreexpresión de TMEM59.

2.4. LA AUSENCIA DE TMEM59 FAVORECE LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR *S. PYOGENES*

Se decidió testar la nueva estirpe de MEFs generada (MEFs +8 y recuperados con TMEM59-HA) en ensayos de citometría de flujo con el objetivo de evaluar la progresión de la infección de *S. pyogenes*-GFP.

Los puntos temporales seleccionados fueron los que en experimentos previos mostraron tanto mejores inducciones de TMEM59 en Western Blot

(Figura 45) como mejores co-localizaciones con los fagolisosomas LAMP1 positivos en ensayos de inmunofluorescencia (Figura 46 y Figura 47).

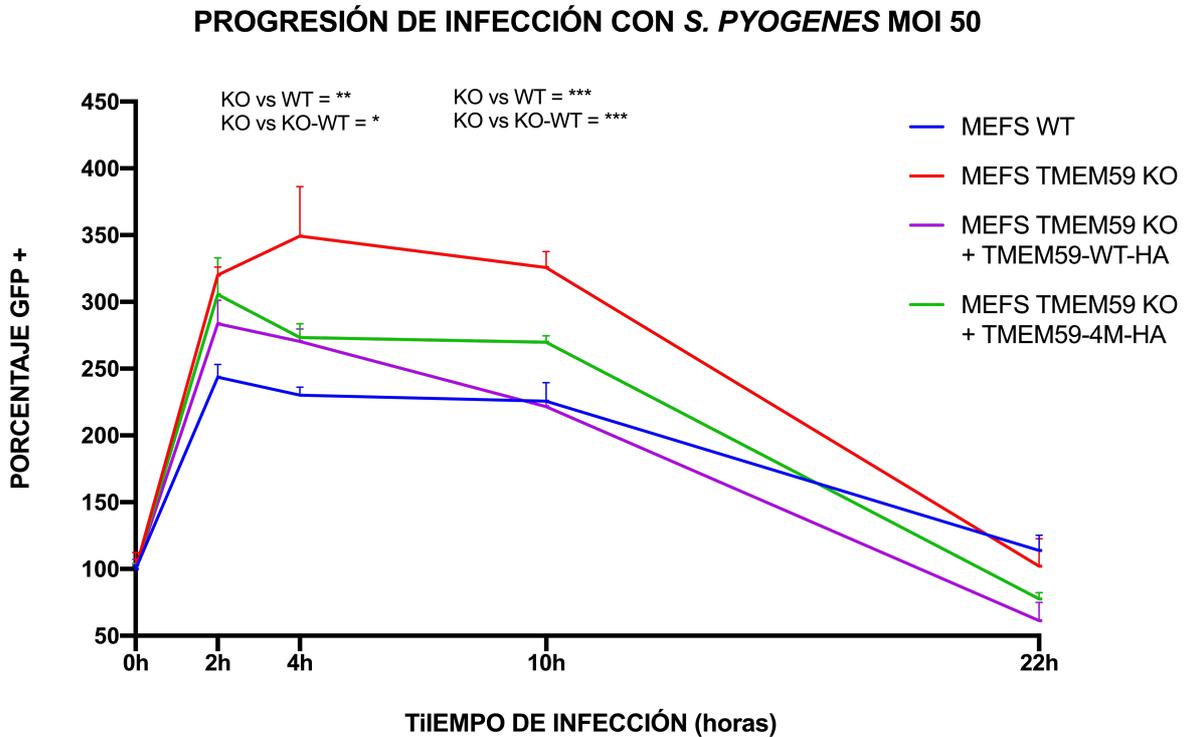


Figura 50. Los MEFs deficientes en TMEM59 controlan peor la infección producida por *S. pyogenes*. La estirpe +8 (MEFs WT, MEFs TMEM59 KO, MEFs TMEM59 KO + TMEM59-WT-HA y MEFs TMEM59 KO + TMEM59-4M-HA) fue infectada con *S. pyogenes* ($OD_{600}=0,85$) a MOI 50 en modalidad de crecimiento en estático. Al finalizar cada tiempo pertinente post-infección, las células se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para citometría de flujo. En cada punto se muestra la media del porcentaje de células positivas para la fluorescencia verde (GFP-*S. pyogenes*), así como su desviación estándar correspondiente a los triplicados realizados. El estadístico utilizado fue la t de student de muestras no pareadas: n.s. indica un p-valor $>0,05$; * indica un p-valor $<0,05$; ** indica un p-valor $<0,01$; *** indica un p-valor $<0,001$; **** indica un p-valor $<0,0001$.

Los resultados obtenidos indican que la infección por *S. pyogenes* progresa mejor en los MEFs deficientes en TMEM59 (MEFs TMEM59 KO) en comparación con el resto de las líneas celulares. Si bien es cierto que todas las líneas acaban combatiendo la infección (t=22 horas), los MEFs deficientes en TMEM59 parecen eliminar la bacteria a partir de las 10 horas mientras que en el resto de las líneas este proceso comienza a partir de las 2 horas post-infección (Figura 50). Esto indica que la ausencia de TMEM59 causa un peor control de la infección a tiempos tempranos y por tanto sugiere que TMEM59 probablemente participe en algún punto en el control de la infección por *S. pyogenes*. Los resultados también muestran que los MEFs recuperados con la versión 4M de TMEM59 controlan la infección al mismo nivel que los recuperados con la versión WT de TMEM59, sugiriendo que la contribución de ATG16L1 en este proceso podría no ser demasiado significativa.

2.5. GENERACIÓN DE MEFs DEFICIENTES EN ATG16L1

Los resultados anteriores parecen sugerir que ATG16L1 no es el principal mediador del efecto que presenta TMEM59 en el control de la infección por *S. pyogenes*. Sin embargo, se ha descrito con anterioridad que ATG16L1 participa en la respuesta xenofágica contra esta bacteria. Para comprobar la contribución de ATG16L1 en la respuesta antibacteriana inducida por TMEM59, se generaron versiones deficientes en ATG16L1 tanto de los MEFs WT como de los ya deficientes en TMEM59 (generando así un doble “*knock-out*” de TMEM59 y ATG16L1) mediante transducción lentiviral (véase *Materiales y métodos* apartado 2.2. *Transducción mediante lentivirus*). Las cuatro estirpes se analizaron en ausencia y presencia de bafilomicina a 75 nM durante 8 horas con el fin de confirmar los niveles de expresión de TMEM59.

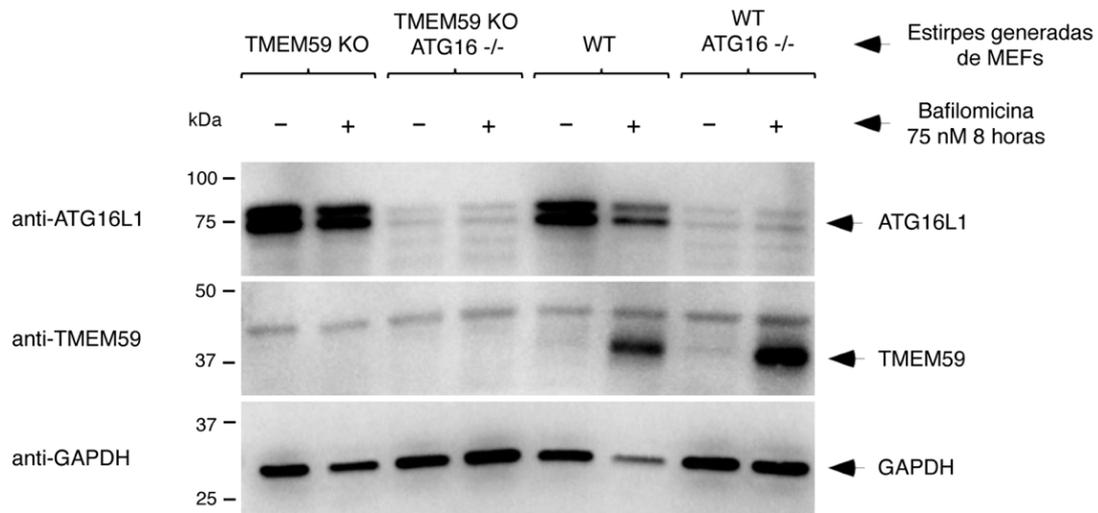


Figura 51. Generación MEFs WT y TMEM59 KO de la estirpe +8 deficientes en ATG16L1.

Los MEFs WT y los MEFs TMEM59 KO (+8) fueron transducidos con un CRISPR de ATG16L1. Tras una semana en selección con puromicina (1 $\mu\text{g/ml}$), las células se lisaron y las muestras se procesaron mediante Western Blot utilizando los anticuerpos indicados para observar la recuperación de las estirpes celulares generadas.

Los resultados confirman la completa delección de ATG16L1 tanto en los MEFs WT como en los MEFs deficientes en TMEM59 (Figura 51). También se confirmó la normal expresión de TMEM59 tanto en los MEFs WT como en los MEFs WT deficientes en ATG16L1 (MEFs TMEM59 KO), así como la ausencia de TMEM59 tanto en los MEFs deficientes en este (MEFs TMEM59 KO) como en el doble “*knock-out*” (MEFs TMEM59 KO ATG16 -/-).

En resumen, el panel que se obtuvo fue una línea de MEFs WT, dos líneas con un “*knock-out*” simple cada una (MEFs TMEM59 KO y MEFs WT ATG16-/-) y una línea doble “*knock-out*” para TMEM59 y ATG16L1 (MEFs TMEM59 KO + ATG16 -/-).

2.6. ATG16L1 NO PARTICIPA EN LA FUNCIÓN XENOFÁGICA DE TMEM59

En los estudios llevados a cabo hasta el momento en el laboratorio, todas las funciones no canónicas atribuidas a TMEM59 implicaban la interacción de éste con ATG16L1. Por ello se quiso analizar la posible contribución de ATG16L1 en esta respuesta xenofágica de TMEM59 frente a la infección por *S. pyogenes*. Para estudiar esto, se utilizaron tanto los MEFs WT como los deficientes en TMEM59, ambos con sus respectivos “*knock-out*” de ATG16L1 (MEFs WT ATG16^{-/-} y MEFs TMEM59 KO ATG16^{-/-}). Los tiempos seleccionados fueron, en la medida de lo posible, lo más parecidos posibles a los mostrados en la Figura 50.

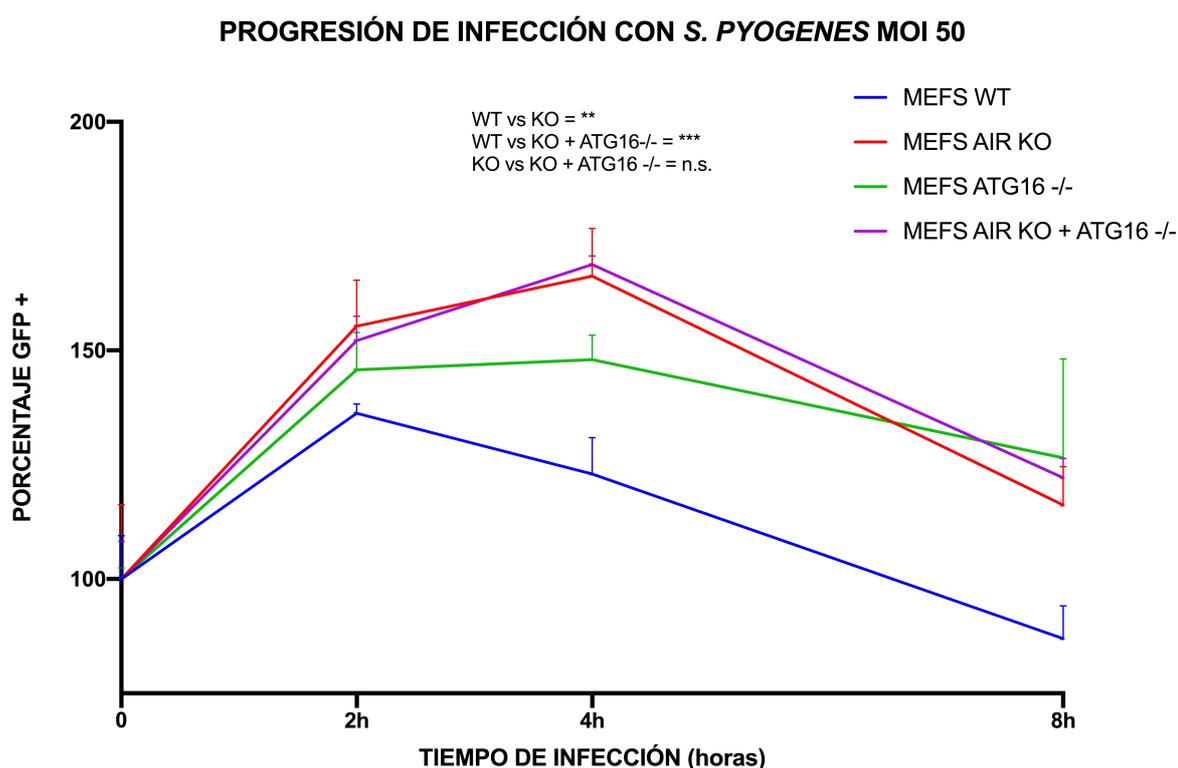


Figura 52. Los MEFs deficientes en TMEM59 y ATG16L1 -/- (dobles "knock-out") se comportan igual que los MEFs deficientes solo en TMEM59. El panel generado en el apartado 2.5. *Generación de MEFs deficientes en ATG16L1* fue infectado con *S. pyogenes* ($OD_{600}=0,85$) a MOI 50 en modalidad de crecimiento en estático. Al finalizar cada tiempo pertinente post-infección, las células se fijaron con PFA al 4% y se procesaron para citometría de flujo. En cada punto se muestra la media del porcentaje de células positivas para la fluorescencia verde (GFP-*S. pyogenes*), así como su desviación estándar correspondiente a los triplicados realizados. El estadístico utilizado fue la t de student de muestras no pareadas: n.s. indica un p-valor $>0,05$; * indica un p-valor $<0,05$; ** indica un p-valor $<0,01$; *** indica un p-valor $<0,001$; **** indica un p-valor $<0,0001$.

Los resultados obtenidos corroboran las conclusiones del anterior experimento (véase Figura 50): los MEFs deficientes en TMEM59 controlan peor la infección a tiempos cortos que los MEFs WT (Figura 52).

Sin embargo, no existen diferencias significativas en el control de la infección entre la estirpe "knock-out" de TMEM59 y las dobles "knock-out" de TMEM59 y ATG16L1. Esto indica que la delección de este último no implica ningún efecto aditivo sobre el ya "knock-out" de TMEM59, lo que sugiere la idea de que las funciones xenofágicas de TMEM59 ante la infección por *S. pyogenes* son efectivamente ATG16L1 independientes.

DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1. ANÁLISIS DE POTENCIALES INTERACTORES CON EL DOMINIO WDD DE ATG16L1

El uso del motivo pro-autofágico encontrado en TMEM59 como molde para encontrar otros potenciales interactores del dominio WD permitió encontrar una colección de moléculas transmembrana de tipo I que contenían alguna versión de este elemento en su dominio intracelular. Del análisis de estas moléculas se obtuvieron varios resultados. Por un lado, se confirmó la interacción de la versión del motivo pro-autofágico encontrado en el receptor de la IL-10 (IL-10RB) y en el receptor de la IL-2 (IL-2RG) con el dominio WD. Por otro lado, otros receptores mostraron una unión al dominio WD independiente de su potencial motivo.

En este último caso, se hipotetizó que esta baja proporción de motivos que realmente interaccionan con el dominio WD se pudiese deber a un sesgo en la propia técnica de refinamiento. Este refinamiento fue necesario ya que el péptido primigenio encontrado en TMEM59 solo poseía cuatro aminoácidos conservados, un motivo que resultó ser demasiado degenerado (Figura 6a) como para las comparaciones bioinformáticas en el banco de secuencias fuesen productivas. El primer sesgo viene dado por el uso de la secuencia contenida en TMEM59 para abordar el estudio de mutagénesis de los microarrays, en lugar de realizar un estudio de conservación aminoacídica de diferentes interactores, cosa que hubiese sido imposible ya que hasta la fecha TMEM59 era el único interactor conocido del dominio WD.

El segundo sesgo viene dado al realizar el cambio de cada aminoácido particular a todos los demás. A pesar de que una posición concreta del motivo pudiese ser más o menos restrictivas a la hora de intercambiarse por otro aminoácido, esta restricción podría venir exigida por el contexto aminoacídico subyacente. Por ejemplo, en una posición muy poco restrictiva como podría ser la prolina 270, se podría intercambiar esta por cualquier otro. Ahora bien, existiría la posibilidad de que al cambiar los aminoácidos adyacentes (valina 269

y serina 271) se produjese algún tipo de cambio a nivel conformacional o espacial que hiciese a la posición 270 mucho más restrictiva y, por tanto, que el motivo refinado final fuese diferente (Figura 6b). La permutación de los cambios de una posición concreta con el resto de posibles combinaciones hace imposible el análisis *in vitro* de la enorme cantidad de diferentes versiones del motivo ($1,46 \cdot 10^{21}$). En todo caso, a pesar de las limitaciones del refinamiento, el motivo quedó validado debido a la asociación del dominio WD al motivo del IL-10RB y del IL-2RG.

Se decidió analizar el dominio intracelular de alguno de los receptores cuya unión al dominio WD era independiente del motivo. Para ello se generaron deleciones C-terminales con el fin de observar en que región se perdía la interacción con el WDD. Las potenciales regiones interactoras de estos receptores (IL-18R1, IL-18RAP, IL-33R) estaban conservadas tanto en diferentes receptores de interleuquinas como en receptores de tipo Toll (TLRs) y moléculas adaptadoras implicadas en las cascadas de señalización de interleuquinas (Tabla 4). El alineamiento de las secuencias de todas estas proteínas dio como resultado un logo de secuencias que muestra dos regiones altamente conservadas (Figura 19).

La primera región conservada (Figura 19a) está caracterizada en la literatura como "box 2". Esta *box* parece estar involucrada en interacciones entre dominios TIR (ref. del cap. 1), formando dímeros entre proteínas que contienen estos dominios. Dado que estos tres receptores (IL-18R1, IL-18RAP, IL-33R) poseen dominios TIR, una posibilidad sería que necesitasen una previa dimerización antes de interactuar con el dominio WD de ATG16L1. Esto sugeriría que el nuevo elemento encontrado podría no interactuar directamente con el WDD, sino que simplemente funcionaría como motivo dimerizador de los receptores para que una vez oligomerizados, estos interactuaran con el motivo original. Esto es, ante

la ausencia de este nuevo elemento, los receptores no dimerizarían y por tanto no podrían interactuar con ATG16L1. Esta “box 2” también se ha visto implicada en cascadas de señalización y mutaciones de ésta en el receptor de la IL-33 (A433) se han relacionado con déficits en la señalización. Por ello, otra posibilidad podría ser que la “box 2” mediase realmente la interacción con el dominio WD de ATG16L1 sin necesidad de dimerización y que los problemas en señalización observados en la literatura se deban a la ausencia de interacción entre los diferentes receptores y el WDD de ATG16L1, tal y como se demostró en el laboratorio para la señalización por IL-10²⁷².

También es posible que fuese la segunda región conservada la encargada de la interacción con el WD de ATG16L1 (Figura 19b). Esta región parece interesante debido a su composición, ya que todos los aminoácidos son básicos salvo una serina (polar sin carga) en el centro de la región. Si fuese esta la región interactora con el dominio WD, existiría la posibilidad de que por un lado la “box 2” siguiese funcionando como dominio dimerizador de los receptores y una vez dimerizados, estas regiones polares se encargasen de interactuar con el WDD para su futura señalización.

Siguiendo esta argumentación, si fuese una región dentro del dominio TIR la encargada de interactuar con el dominio WD de ATG16, esto podría sugerir que el WDD podría interactuar con otros dominios TIR presentes en otras moléculas como los TLRs. En todas las hipótesis anteriormente mencionadas, el dominio WD podría funcionar como nodo señalizador de receptores tanto de interleuquinas como de tipo Toll (TLRs).

A continuación, se muestra un esquema de todos los receptores de interleuquinas estudiados en el *Capítulo 1* de esta tesis doctoral (Figura 53)

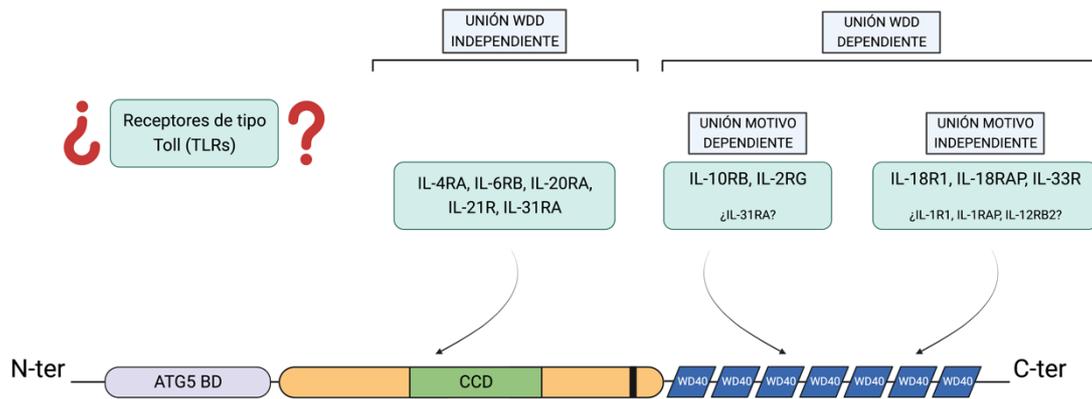


Figura 53. Esquema de los diferentes receptores de interleuquinas estudiados y su relación con ATG16L1. El esquema representa como ATG16L1 podría funcionar como nodo señalizador. A estos receptores de interleuquinas habría que añadir la posibilidad de que los receptores de tipo Toll (TLRs) también interaccionasen con ATG16L1 de manera WDD dependiente.

CAPÍTULO 2. TMEM59 Y SU RELACIÓN CON AUTOFAGIA NO CANÓNICA

En el capítulo 2 de esta tesis (véase *Capítulo 2 apartado 1.3. TMEM59 es una proteína lisosomal*) se demuestra que TMEM59 es una proteína que se localiza en los lisosomas (Figura 22). Durante el estudio de co-localización se observó que todas las estructuras TMEM59 positivas eran también LAMP1 positivas. Es decir, todas las vesículas de TMEM59 son lisosomas. Sorprendentemente, también se observó que solo un 75% de las estructuras LAMP1 positivas eran TMEM59 positivas. Es decir, mientras que el 75% de los lisosomas poseen TMEM59 en sus membranas, un 25% de los lisosomas carecen de él. Esto sugiere la idea de que TMEM59 podría tener una función concreta que no fuese meramente estructural, ya que existen lisosomas que no lo tienen en sus membranas.

Trabajo previo del laboratorio reveló la capacidad de TMEM59 para inducir autofagia no canónica, siendo esta capaz de lipidar las propias vesículas de membrana simple donde se encuentra. Además, se ha descrito que la v-ATPasa tiene un papel central en la autofagia no canónica, y más recientemente, se ha establecido que el fragmento citosólico (V_1) de esta interacciona con el dominio WD de ATG16L1 como eje principal del proceso. Además, en la literatura también se describen las mutaciones F467A y K490A de ATG16L1 como esenciales en este proceso ya que su mutación a alanina inhibe la interacción entre el WDD y la v-ATPasa^{193,210}.

Sin embargo, en este trabajo se demuestra que TMEM59 no interacciona con el dominio WD de ATG16L1 a través de estos residuos (Figura 24 y Figura 25), mientras que su actividad de lipidación de LC3 sí que los requiere (Figura 28). Por un lado, TMEM59 interacciona directamente con el WDD de ATG16L1 de forma F467 y K490 independiente. Por otro lado, ATG16L1 se une a la v-ATPasa de una manera dependiente de ambos residuos para inducir la lipidación de LC3. Según este modelo, la actividad de TMEM59 requeriría de la v-ATPasa simplemente porque ATG16L1 la necesita en algún punto para lipidar LC3, y explicaría por qué los mutantes no afectan a la asociación del complejo ATG16L1/TMEM59, mientras que sí afectan a la lipidación de LC3.

Yue Xu et. al en su estudio sobre el eje ATG16L1/ATPasa identifican una proteína bacteriana denominada SopF que es capaz de interferir en esta interacción mediante la ribosilación de una subunidad del fragmento transmembrana de la ATPasa (V_0). De forma inesperada, en este trabajo de tesis se demuestra que SopF también bloquea la lipidación de LC3 lipidado producida por la sobreexpresión de TMEM59 (Figura 31b), lo que sugiere que la función lipidadora de TMEM59 dependería del eje ATG16L1/ATPasa. Además, en estos estudios se observa también que la interacción ATG16L1/TMEM59 no se ve afectada en presencia de SopF (Figura 33), lo que

robustece la idea de que primero se produciría la asociación de TMEM59 con ATG16L1 y en segundo lugar se uniría ATG16L1 a la v-ATPasa para activar la lipidación de LC3.

Siguiendo esta hipótesis en la que ATG16L1 podría interaccionar tanto con la porción citosólica de la ATPasa (V_1) como con TMEM59, se pensó que podría existir una interacción entre TMEM59 y la ATPasa que pudiese contribuir a la estabilización del posible complejo TMEM59/ATG16L1/v-ATPasa. Los resultados del segundo capítulo de esta tesis doctoral muestran una fuerte asociación entre los fragmentos V_0 (Figura 34) y V_1 (Figura 40) de la ATPasa y TMEM59.

De los estudios destinados a determinar la región interactora de TMEM59 con la V_{0c} , uno de los datos más informativos se obtuvo con la construcción ΔID (Δ dominio intracelular). Esta construcción fue capaz de precipitar eficientemente la V_{0c} , demostrando que el dominio intracelular de TMEM59 no es el encargado de la interacción con la V_{0c} . Es cierto que, a lo largo del estudio, nunca se consiguió obtener una expresión de la construcción ΔID comparable al resto de deleciones C-terminales de TMEM59 posiblemente debidas a alteraciones en el tráfico normal de la proteína.

Para confirmar que es el dominio transmembrana de TMEM59 el responsable de su unión a la V_{0c} , se generaron unas proteínas quiméricas en las que la porción transmembrana y la porción extracelular de TMEM59 se encontraban segregadas. Al someter estas construcciones a inmunoprecipitación (Figura 38b) se observó un fenómeno interesante: todas las condiciones donde se encontraba presente la transmembrana de TMEM59, presentaban una mayor expresión de la V_{0c} que aquellas condiciones que carecían de la porción transmembrana, donde los niveles de la V_{0c} eran menores. A falta de conocer exactamente el mecanismo

subyacente, estos datos sugieren la existencia de un posible efecto funcional en el que la sobreexpresión de la transmembrana de TMEM59, de alguna manera promovería la sobreexpresión de la V_{0c} , quizás estabilizado a la proteína o alterando el tráfico lisosomal.

Se barajó la idea de que esta interacción TMEM59/ V_{0c} estuviese involucrada en la función lipídadora de TMEM59. Los resultados de inmunoprecipitación en presencia de SopF descartaron esta posibilidad, ya que la asociación TMEM59/ V_{0c} no se vio afectada (Figura 35). Además, anteriores trabajos del laboratorio probaron que la construcción ΔID no posee capacidad lipídadora¹⁸⁶, mientras que en este trabajo se demuestra que esta misma construcción retiene la capacidad de interacción con la V_{0c} . Esto sugiere que esta novedosa interacción entre TMEM59 y la V_{0c} no estaría implicada en la función lipídadora de TMEM59, sino que tendría otro cometido.

Dado que TMEM59 interacciona con ATG16L1¹⁸⁶ y este a su vez se asocia a la V_{1A} ²¹², se creyó que quizás TMEM59 pudiese interaccionar no solo con la V_{0c} , sino también con la V_{1A} . Efectivamente, esta posibilidad fue confirmada por los ensayos de co-inmunoprecipitación mostrados en la Figura 40. Además, a partir de estos ensayos se deduce que dicha interacción es independiente de la activación de la autofagia no canónica, ya que esta interacción se observa tanto en ausencia como en presencia de un estímulo activador como la monensina. Por tanto, de la misma manera que se concluyó con la interacción entre TMEM59 y la subunidad V_{0c} : la asociación de TMEM59 y la V_{1A} también parece tener una función independiente de la ruta no canónica de la autofagia.

Dado que la porción V_1 es completamente citosólica, se asumió que la única región de TMEM59 potencialmente accesible a esta subunidad podría ser el dominio intracelular. Por ello, se testó la capacidad de unión de la V_{1A} a las diferentes delecciones intracelulares de TMEM59. En los resultados obtenidos de estos experimentos se concluyó que la región interactora se encontraría en la

porción más C-terminal de la región intracelular (290-320). Previo trabajo del laboratorio evidenció que esta región no tiene capacidad de lipidación de LC3, ya que esta se encuentra exclusivamente localizada en el péptido pro-autofágico (260-282)¹⁸⁶. Esto robustece aún más la idea de que esta nueva asociación TMEM59/V₁A posee otra función que no conlleva la lipidación de LC3.

El hecho de que ambas porciones (V₀ y V₁) de la ATPasa interaccionen con TMEM59 en regiones diferentes y que ninguna de estas zonas de interacción tenga capacidad lipidadora hace pensar que TMEM59 pudiese tener algún tipo de influencia o control sobre la ATPasa de forma independiente de sus actividades autofágicas. Una teoría plausible sería que TMEM59 fuese un sensor que, tras un estímulo, aún desconocido, fuese capaz de acoplar o desacoplar y, por tanto, activar o inactivar la función de la ATPasa. Este posible papel de TMEM59 en el acoplamiento o desacoplamiento de la ATPasa sería independiente de su actividad lipidadora de LC3.

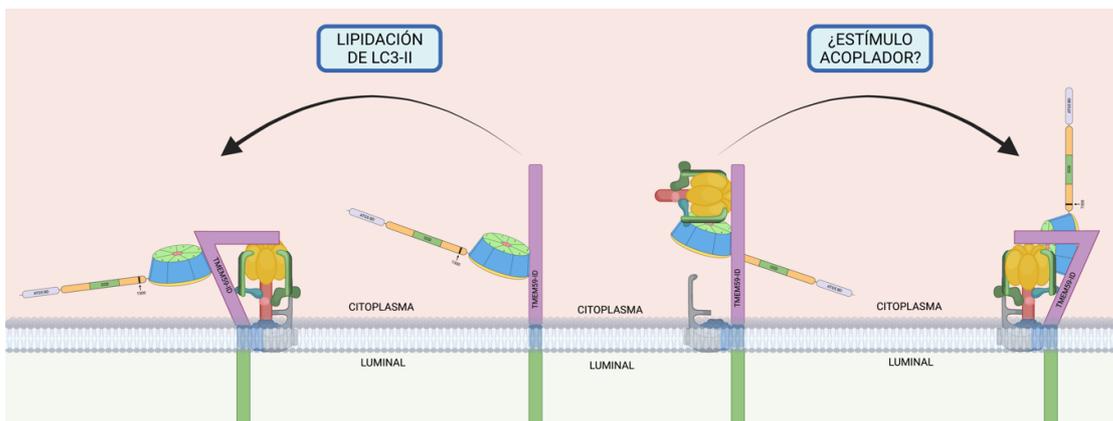


Figura 54. Esquema de la posible doble función de TMEM59. Por un lado, TMEM59 se asociaría primero con ATG16L1 para después interaccionar con la ATPasa y lipidar LC3. Por otro lado, funcionaría como acoplador de ambos fragmentos de la ATPasa ante un potencial estímulo aún desconocido. En este caso, ATG16L1 podría participar y ayudar en el acoplamiento formando un complejo triple.

CAPÍTULO 3. TMEM59 Y SU PAPEL EN XENOFAGIA

Al estudiar el papel de TMEM59 en una posible respuesta xenofágica frente a *S. pyogenes*, se realizaron cinéticas de infección para observar si TMEM59 tiende a co-localizar con el fagolisosoma bacteriano (Figura 46 y Figura 47). En estas figuras citadas anteriormente, se muestran las estructuras más representativas. Además, observamos diferentes tipos de estructuras que se muestran resumidas en la Figura 48.

En todas las estructuras observadas siempre parece cumplirse una función encapsuladora por parte de las estructuras LAMP1 positivas. Este proceso comenzaría formando una cápsula voluminosa sin fragmentar (Figura 48a) que en estadios más avanzados acaba tabicándose hasta el punto de formar compartimentos estancos para cada coco o diplococo bacteriano (Figura 48b).

En el caso de las vesículas TMEM59 positivas, se aprecia la presencia de estructuras vesiculares asociadas a la cara externa de las cápsulas LAMP1 positivas en los tiempos cortos post-infección (t=4h, t=8h) (Figura 48c). Estas vesículas TMEM59 positivas acabarán formando parte de las cápsulas formadas por LAMP1 anteriormente descritas (t=8h, t=16h) (Figura 48d). También aparecen de manera inusual algunas estructuras capsulares TMEM59 positivas similares a las capsulas formadas por LAMP1 en estadios avanzados. Este nivel de encapsulamiento de TMEM59 solo se aprecia cuando las bacterias forman agregados globulares y también en cadenas de cocos de los estados más avanzados (t=16h y 24h) (Figura 48b y Figura 48e).

Se hipotetizo entonces que esta diferencia de comportamiento entre ambas proteínas podría implicar también una diferencia funcional. Una posible explicación sería que los lisosomas que inicialmente acuden al fagosoma bacteriano son LAMP1 positivos, y en una segunda oleada acuden vesículas TMEM59 positivas como refuerzo a la actividad lisosomal. Como se discutió previamente (véase *Discusión* apartado *Capítulo 2: TMEM59 y su relación con*

autofagia no canónica), TMEM59 interacciona con ambas subunidades de la ATPasa pudiendo funcionar como un posible inductor del acoplamiento de la v-ATPasa que promovería la acidificación del lisosoma. Existiría la posibilidad de que vesículas TMEM59 positivas acudieran a estas cápsulas de LAMP1 con el fin de transportar y ensamblar más fragmentos de la ATPasa en estos lisosomas, acidificando más su interior con el fin de degradar más efectivamente la bacteria encapsulada.

Estudios previos de otros grupos muestran cómo *S. pyogenes* es capaz de inactivar y eliminar la ATPasa de los fagosomas en los que se encuentra, bloqueando la correcta acidificación de estos y promoviendo la progresión de la infección²⁸⁸. Este efecto está controlado por un regulador transcripcional llamado Mga que codifica para factores de virulencia de la membrana bacteriana. Las bacterias carentes de este factor son fácilmente degradadas ya que existe un correcto transporte de la ATPasa a los fagosomas que contienen la bacteria. Es posible entonces que este transporte de la ATPasa a los fagosomas pueda ser mediado por TMEM59. Esta teoría implicaría que quizás alguna proteína de la superficie bacteriana de *S. pyogenes* codificada por el regulador transcripcional Mga, podría ser capaz de interactuar con TMEM59 e inactivar esta función transportadora de ATPasa.

Dado que previamente se ha demostrado que TMEM59 está involucrado en la respuesta frente a *S. aureus*, y también en este trabajo se demuestra su participación en la respuesta frente a *S. pyogenes*, se baraja la posibilidad de que el dominio extracelular de TMEM59 pudiese funcionar como receptor de alguna proteína de superficie de ambas bacteria. Sin embargo, esta hipótesis probablemente requeriría una co-localización más temprana entre la bacteria y TMEM59, cosa que no se observa en los datos obtenidos por microscopía confocal (Figura 46 y Figura 47)

CONCLUSIONES

1. El motivo refinado de unión al dominio WD de ATG16L1 es capaz de identificar nuevos interactores fisiológicamente relevantes como el IL-2RG o el IL-10RB.
2. Los receptores IL-1RAP, IL-18RAP, IL-18R1 y IL-33R se unen de manera específica al WDD de ATG16L1, pero sus potenciales motivos pro-autofágicos encontrados en la región intracelular no median esta interacción.
3. La secuencia de los receptores IL-18RAP, IL-18R1 y IL-33R que interacciona con el WDD se encuentra dentro del dominio TIR y contiene dos regiones conservadas: una "box 2" encargada de interacciones entre dominios TIR y señalización celular y otra región cuya función es desconocida.
4. TMEM59 es una proteína lisosomal y su ausencia no parece alterar la estructura ni la localización subcelular de los lisosomas.
5. Las mutaciones F467A y K490A no alteran la interacción de ATG16L1 y TMEM59, pero sí bloquean la actividad de lipidación de LC3 producida por TMEM59.
6. SopF no inhibe la unión entre ATG16L1 y TMEM59, pero sí la actividad de lipidación de LC3 producida por TMEM59.
7. TMEM59 se une a la v-ATPasa: A la porción transmembrana asociándose a la subunidad V_{0c} posiblemente a través de sus dominios transmembrana, y a la porción citosólica interaccionando con la subunidad V_{1A} a través de su dominio intracelular.
8. La interacción de TMEM59 con la V_{0c} no se ve alterada por SopF.
9. TMEM59 se induce en respuesta a la infección bacteriana por *S. pyogenes* y co-localiza con LAMP1 en cápsulas que contienen *S. pyogenes*.
10. TMEM59 reprime la infección por *S. pyogenes*, siendo este proceso independiente de ATG16L1.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ravikumar, B. et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* **90**, 1383–1435 (2010).
2. Starokadomskyy, P. & Dmytruk, K. V. A bird's-eye view of autophagy. *Autophagy* **9**, 1121–1126 (2013).
3. Galluzzi, L. et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811–1836 (2017).
4. Podar, M., Wall, M. A., Makarova, K. S. & Koonin, E. V. The prokaryotic V4R domain is the likely ancestor of a key component of the eukaryotic vesicle transport system. *Biol. Direct* **3**, 2 (2008).
5. Darwin, K. H. PROKARYOTIC UBIQUITIN-LIKE PROTEIN, PROTEASOMES, AND PATHOGENESIS. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 485–491 (2009).
6. Mashburn-Warren, L. M. & Whiteley, M. Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **61**, 839–846 (2006).
7. Levine, T. P. Remote homology searches identify bacterial homologues of eukaryotic lipid transfer proteins, including Chorein-N domains in TamB and AsmA and Mdm31p. *BMC Mol. Cell Biol.* **20**, 43 (2019).
8. Ye, Q. et al. HORMA Domain Proteins and a Trip13-like ATPase Regulate Bacterial cGAS-like Enzymes to Mediate Bacteriophage Immunity. *Mol. Cell* **77**, 709-722.e7 (2020).
9. Kristensen, A. R. et al. Ordered Organelle Degradation during Starvation-induced Autophagy. *Mol. Cell. Proteomics* **7**, 2419–2428 (2008).
10. Levine, B. & Kroemer, G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell* **176**, 11–42 (2019).
11. Ashrafi, G. & Schwarz, T. L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 31–42 (2013).
12. Wyant, G. A. et al. NUFIP1 is a ribosome receptor for starvation-induced ribophagy. *Science* **360**, 751–758 (2018).
13. Mochida, K. & Nakatogawa, H. ER-phagy: selective autophagy of the

- endoplasmic reticulum. *EMBO Rep.* **23**, e55192 (2022).
14. Katarzyna, Z.-R. & Suresh, S. Autophagic degradation of peroxisomes in mammals. *Biochem. Soc. Trans.* **44**, 431–440 (2016).
 15. Hung, Y.-H., Chen, L. M.-W., Yang, J.-Y. & Yuan Yang, W. Spatiotemporally controlled induction of autophagy-mediated lysosome turnover. *Nat. Commun.* **4**, 2111 (2013).
 16. Lamark, T. & Johansen, T. Aggrephagy: Selective Disposal of Protein Aggregates by Macroautophagy. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 736905 (2012).
 17. Klionsky, D. J. et al. Autophagy in major human diseases. *EMBO J.* **40**, e108863 (2021).
 18. Eskelinen, E.-L. & Saftig, P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 664–673 (2009).
 19. Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T. & Seglen, P. O. Isolation and Characterization of Rat Liver Amphisomes: EVIDENCE FOR FUSION OF AUTOPHAGOSOMES WITH BOTH EARLY AND LATE ENDOSOMES *. *J. Biol. Chem.* **273**, 21883–21892 (1998).
 20. Trivedi, P. C., Bartlett, J. J. & Pulinilkunnil, T. Lysosomal Biology and Function: Modern View of Cellular Debris Bin. *Cells* **9**, 1131 (2020).
 21. Chiang, H. L. & Dice, J. F. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* **263**, 6797–6805 (1988).
 22. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol.* **22**, 407–417 (2012).
 23. Bourdenx, M. et al. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome. *Cell* **184**, 2696-2714.e25 (2021).
 24. Todde, V., Veenhuis, M. & van der Klei, I. J. Autophagy: principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 3–13

- (2009).
25. Manjithaya, R., Nazarko, T. Y., Farre, J.-C. & Subramani, S. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1367–1373 (2010).
 26. Kunz, J. B., Schwarz, H. & Mayer, A. Determination of Four Sequential Stages during Microautophagy in Vitro. *J. Biol. Chem.* **279**, 9987–9996 (2004).
 27. Seo, A. Y. et al. AMPK and vacuole-associated Atg14p orchestrate μ -lipophagy for energy production and long-term survival under glucose starvation. *eLife* **6**, e21690 (2017).
 28. Krick, R. et al. Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Mol. Biol. Cell* **19**, 4492–4505 (2008).
 29. Roberts, P. et al. Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 129–141 (2003).
 30. Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R. J. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673–682 (2011).
 31. Mijaljica, D., Prescott, M., Klionsky, D. J. & Devenish, R. J. Autophagy and Vacuole Homeostasis: A Case for Self-Degradation? *Autophagy* **3**, 417–421 (2007).
 32. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–174 (1993).
 33. Harding, T. M., Hefner-Gravink, A., Thumm, M. & Klionsky, D. J. Genetic and Phenotypic Overlap between Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Protein Targeting Pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 17621–17624 (1996).
 34. Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L. K., Keller, G. A. & Subramani, S. Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific

- steps and morphological intermediates. *J. Cell Biol.* **141**, 625–636 (1998).
35. Titorenko, V. I., Keizer, I., Harder, W. & Veenhuis, M. Isolation and characterization of mutants impaired in the selective degradation of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Bacteriol.* **177**, 357–363 (1995).
 36. Klionsky, D. J. et al. A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev. Cell* **5**, 539–545 (2003).
 37. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 458–467 (2009).
 38. Zoncu, R., Sabatini, D. M. & Efeyan, A. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 21–35 (2011).
 39. Kim, L. C., Cook, R. S. & Chen, J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene* **36**, 2191–2201 (2017).
 40. Hosokawa, N. et al. Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1981–1991 (2009).
 41. Kamada, Y. et al. Tor Directly Controls the Atg1 Kinase Complex To Regulate Autophagy. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1049–1058 (2010).
 42. Martina, J. A., Chen, Y., Gucek, M. & Puertollano, R. MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**, 903–914 (2012).
 43. Mammucari, C. et al. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab.* **6**, 458–471 (2007).
 44. He, C. & Klionsky, D. J. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 67–93 (2009).
 45. Gwinn, D. M. et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic

- checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226 (2008).
46. Chen, Y. & Gibson, S. B. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy? *Autophagy* **4**, 246–248 (2008).
 47. Kabeya, Y. et al. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J. Cell Sci.* **117**, 2805–2812 (2004).
 48. Scherz-Shouval, R. et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **26**, 1749–1760 (2007).
 49. Chang, K.-C. et al. The interplay of autophagy and oxidative stress in the pathogenesis and therapy of retinal degenerative diseases. *Cell Biosci.* **12**, 1 (2022).
 50. Sarkar, S. et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* **170**, 1101–1111 (2005).
 51. Williams, A. et al. Novel targets for Huntington’s disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nat. Chem. Biol.* **4**, 295–305 (2008).
 52. Soto-Burgos, J., Zhuang, X., Jiang, L. & Bassham, D. C. Dynamics of Autophagosome Formation1[OPEN]. *Plant Physiol.* **176**, 219–229 (2018).
 53. Kim, J., Huang, W.-P., Stromhaug, P. E. & Klionsky, D. J. Convergence of Multiple Autophagy and Cytoplasm to Vacuole Targeting Components to a Perivacuolar Membrane Compartment Prior to de Novo Vesicle Formation. *J. Biol. Chem.* **277**, 763–773 (2002).
 54. Abounit, K., Scarabelli, T. M. & McCauley, R. B. Autophagy in mammalian cells. *World J. Biol. Chem.* **3**, 1–6 (2012).
 55. Hailey, D. W. et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656–667 (2010).
 56. Shima, T., Kirisako, H. & Nakatogawa, H. COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *J. Cell Biol.* **218**, 1503–1510 (2019).

57. Hayashi-Nishino, M. *et al.* A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1433–1437 (2009).
58. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **12**, 747–757 (2010).
59. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
60. Cheong, H., Nair, U., Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg1 Kinase Complex Is Involved in the Regulation of Protein Recruitment to Initiate Sequestering Vesicle Formation for Nonspecific Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **19**, 668–681 (2008).
61. Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T. & Ohsumi, Y. Organization of the Pre-autophagosomal Structure Responsible for Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2039–2050 (2008).
62. Cheong, H. *et al.* Atg17 Regulates the Magnitude of the Autophagic Response. *Mol. Biol. Cell* **16**, 3438–3453 (2005).
63. Noda, T., Suzuki, K. & Ohsumi, Y. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* **12**, 231–235 (2002).
64. Yang, Z. & Klionsky, D. J. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **335**, 1–32 (2009).
65. Graef, M., Friedman, J. R., Graham, C., Babu, M. & Nunnari, J. ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol. Biol. Cell* **24**, 2918–2931 (2013).
66. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).

67. Mercer, T. J., Gubas, A. & Tooze, S. A. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. *J. Biol. Chem.* **293**, 5386–5395 (2018).
68. Hollenstein, D. M. & Kraft, C. Autophagosomes are formed at a distinct cellular structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* **65**, 50–57 (2020).
69. Di Bartolomeo, S. *et al.* The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J. Cell Biol.* **191**, 155–168 (2010).
70. Melia, T. J., Lystad, A. H. & Simonsen, A. Autophagosome biogenesis: From membrane growth to closure. *J. Cell Biol.* **219**, e202002085 (2020).
71. Araki, Y. *et al.* Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.* **203**, 299–313 (2013).
72. Obara, K., Sekito, T., Niimi, K. & Ohsumi, Y. The Atg18-Atg2 Complex Is Recruited to Autophagic Membranes via Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Exerts an Essential Function. *J. Biol. Chem.* **283**, 23972–23980 (2008).
73. Reggiori, F., Tucker, K. A., Stromhaug, P. E. & Klionsky, D. J. The Atg1-Atg13 Complex Regulates Atg9 and Atg23 Retrieval Transport from the Pre-Autophagosomal Structure. *Dev. Cell* **6**, 79–90 (2004).
74. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).
75. Dooley, H. C. *et al.* WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12–5-16L1. *Mol. Cell* **55**, 238–252 (2014).
76. Schaaf, M. B. E., Keulers, T. G., Vooijs, M. A. & Rouschop, K. M. A. LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *FASEB J.*

- 30**, 3961–3978 (2016).
77. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).
 78. Birgisdottir, Å. B., Lamark, T. & Johansen, T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell Sci.* **126**, 3237–3247 (2013).
 79. Mizushima, N. & Yoshimori, T. How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* **3**, 542–545 (2007).
 80. Pankiv, S. *et al.* FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J. Cell Biol.* **188**, 253–269 (2010).
 81. Nguyen, T. N. *et al.* Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J. Cell Biol.* **215**, 857–874 (2016).
 82. Mizushima, N. *et al.* A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395–398 (1998).
 83. Mizushima, N. *et al.* Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* **116**, 1679–1688 (2003).
 84. Fujita, N. *et al.* The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2092–2100 (2008).
 85. Hemelaar, J., Lelyveld, V. S., Kessler, B. M. & Ploegh, H. L. A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L *. *J. Biol. Chem.* **278**, 51841–51850 (2003).
 86. Kakuta, S. *et al.* Atg9 Vesicles Recruit Vesicle-tethering Proteins Trs85 and Ypt1 to the Autophagosome Formation Site *. *J. Biol. Chem.* **287**, 44261–

- 44269 (2012).
87. Puri, C. *et al.* The RAB11A-Positive Compartment Is a Primary Platform for Autophagosome Assembly Mediated by WIPI2 Recognition of PI3P-RAB11A. *Dev. Cell* **45**, 114-131.e8 (2018).
 88. Laraia, L. *et al.* The cholesterol transfer protein GRAMD1A regulates autophagosome biogenesis. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 710–720 (2019).
 89. Valverde, D. P. *et al.* ATG2 transports lipids to promote autophagosome biogenesis. *J. Cell Biol.* **218**, 1787–1798 (2019).
 90. Maeda, S., Otomo, C. & Otomo, T. The autophagic membrane tether ATG2A transfers lipids between membranes. *eLife* **8**, e45777 (2019).
 91. Gómez-Sánchez, R. *et al.* Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores. *J. Cell Biol.* **217**, 2743–2763 (2018).
 92. Tang, Z. *et al.* TOM40 Targets Atg2 to Mitochondria-Associated ER Membranes for Phagophore Expansion. *Cell Rep.* **28**, 1744-1757.e5 (2019).
 93. Jiang, W. *et al.* Key Regulators of Autophagosome Closure. *Cells* **10**, 2814 (2021).
 94. Vietri, M., Radulovic, M. & Stenmark, H. The many functions of ESCRTs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 25–42 (2020).
 95. Christ, L., Raiborg, C., Wenzel, E. M., Campsteijn, C. & Stenmark, H. Cellular Functions and Molecular Mechanisms of the ESCRT Membrane-Scission Machinery. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 42–56 (2017).
 96. Zhou, F. *et al.* Rab5-dependent autophagosome closure by ESCRT. *J. Cell Biol.* **218**, 1908–1927 (2019).
 97. Langemeyer, L., Fröhlich, F. & Ungermann, C. Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. *Trends Cell Biol.* **28**, 957–970 (2018).
 98. Wu, Z., Xu, H., Liu, J., Zhou, F. & Liang, Y. The ESCRT-III complex contributes to macromitophagy in yeast. *Traffic* **22**, 258–273 (2021).

99. Hilverling, A. *et al.* Maturing Autophagosomes are Transported Towards the Cell Periphery. *Cell. Mol. Neurobiol.* **42**, 155–171 (2022).
100. Johnson, D. E., Ostrowski, P., Jaumouillé, V. & Grinstein, S. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J. Cell Biol.* **212**, 677–692 (2016).
101. Manil-Ségalen, M. *et al.* The *C. elegans* LC3 Acts Downstream of GABARAP to Degrade Autophagosomes by Interacting with the HOPS Subunit VPS39. *Dev. Cell* **28**, 43–55 (2014).
102. Yu, Z.-Q. *et al.* Dual roles of Atg8–PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* **8**, 883–892 (2012).
103. Lőrincz, P. & Juhász, G. Autophagosome-Lysosome Fusion. *J. Mol. Biol.* **432**, 2462–2482 (2020).
104. Lőrincz, P. *et al.* Rab2 promotes autophagic and endocytic lysosomal degradation. *J. Cell Biol.* **216**, 1937–1947 (2017).
105. Khatter, D. *et al.* The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex to lysosomes. *J. Cell Sci.* jcs.162651 (2015) doi:10.1242/jcs.162651.
106. Amaya, C., Militello, R. D., Calligaris, S. D. & Colombo, M. I. Rab24 interacts with the Rab7/Rab interacting lysosomal protein complex to regulate endosomal degradation. *Traffic Cph. Den.* **17**, 1181–1196 (2016).
107. Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* **192**, 839–853 (2011).
108. Saleeb, R. S., Kavanagh, D. M., Dun, A. R., Dalgarno, P. A. & Duncan, R. R. A VPS33A-binding motif on syntaxin 17 controls autophagy completion in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **294**, 4188–4201 (2019).
109. Krämer, L. & Ungermann, C. HOPS drives vacuole fusion by binding the vacuolar SNARE complex and the Vam7 PX domain via two distinct sites.

- Mol. Biol. Cell* **22**, 2601–2611 (2011).
110. Orr, A., Song, H., Rusin, S. F., Kettenbach, A. N. & Wickner, W. HOPS catalyzes the interdependent assembly of each vacuolar SNARE into a SNARE complex. *Mol. Biol. Cell* **28**, 975–983 (2017).
 111. Diao, J. *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* **520**, 563–566 (2015).
 112. Rogov, V., Dötsch, V., Johansen, T. & Kirkin, V. Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Mol. Cell* **53**, 167–178 (2014).
 113. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
 114. Noda, N. N. *et al.* Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* **13**, 1211–1218 (2008).
 115. Behrends, C. & Fulda, S. Receptor Proteins in Selective Autophagy. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 673290 (2012).
 116. Herhaus, L. & Dikic, I. Regulation of Salmonella-host cell interactions via the ubiquitin system. *Int. J. Med. Microbiol. IJMM* **308**, 176–184 (2018).
 117. Watson, R. O. *et al.* The Cytosolic Sensor cGAS Detects Mycobacterium tuberculosis DNA to Induce Type I Interferons and Activate Autophagy. *Cell Host Microbe* **17**, 811–819 (2015).
 118. Heo, J.-M., Ordureau, A., Paulo, J. A., Rinehart, J. & Harper, J. W. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol. Cell* **60**, 7–20 (2015).
 119. Petkova, D. S. *et al.* Distinct Contributions of Autophagy Receptors in Measles Virus Replication. *Viruses* **9**, 123 (2017).
 120. Korac, J. *et al.* Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic

- clearance of protein aggregates. *J. Cell Sci.* **126**, 580–592 (2013).
121. Wild, P. *et al.* Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* **333**, 228–233 (2011).
 122. Tumbarello, D. A. *et al.* The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of Salmonella Typhimurium by Autophagy. *PLOS Pathog.* **11**, e1005174 (2015).
 123. Jiang, S., Wells, C. D. & Roach, P. J. Starch-binding domain-containing protein 1 (Stbd1) and glycogen metabolism: Identification of the Atg8 family interacting motif (AIM) in Stbd1 required for interaction with GABARAPL1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**, 420–425 (2011).
 124. Chino, H., Hatta, T., Natsume, T. & Mizushima, N. Intrinsically Disordered Protein TEX264 Mediates ER-phagy. *Mol. Cell* **74**, 909-921.e6 (2019).
 125. Zhang, Y. *et al.* Listeria hijacks host mitophagy through a novel mitophagy receptor to evade killing. *Nat. Immunol.* **20**, 433–446 (2019).
 126. Kimura, T. *et al.* Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *EMBO J.* **36**, 42–60 (2017).
 127. Green, D. R. & Kroemer, G. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* **305**, 626–629 (2004).
 128. Ma, K. *et al.* Mitophagy, Mitochondrial Homeostasis, and Cell Fate. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 129. Ham, S. J. *et al.* Decision between mitophagy and apoptosis by Parkin via VDAC1 ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117**, 4281–4291 (2020).
 130. Joaquim, M. & Escobar-Henriques, M. Role of Mitofusins and Mitophagy in Life or Death Decisions. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 131. Lazarou, M. *et al.* The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**, 309–314 (2015).
 132. Richter, B. *et al.* Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to

- Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4039–4044 (2016).
133. Wei, Y., Chiang, W.-C., Sumpter, R., Mishra, P. & Levine, B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* **168**, 224–238.e10 (2017).
134. Springer, M. Z. & Macleod, K. F. Mitophagy: Mechanisms and Role in Human Disease. *J. Pathol.* **240**, 253–255 (2016).
135. Van Humbeeck, C. et al. Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **31**, 10249–10261 (2011).
136. Strappazzon, F. et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ.* **22**, 419–432 (2015).
137. Sargent, G. et al. PEX2 is the E3 ubiquitin ligase required for pexophagy during starvation. *J. Cell Biol.* **214**, 677–690 (2016).
138. Yamashita, S., Abe, K., Tatemichi, Y. & Fujiki, Y. The membrane peroxin PEX3 induces peroxisome-ubiquitination-linked pexophagy. *Autophagy* **10**, 1549–1564 (2014).
139. Nordgren, M. et al. Export-deficient monoubiquitinated PEX5 triggers peroxisome removal in SV40 large T antigen-transformed mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy* **11**, 1326–1340 (2015).
140. Li, X. et al. Proteomic Analysis of the Human Tankyrase Protein Interaction Network Reveals Its Role in Pexophagy. *Cell Rep.* **20**, 737–749 (2017).
141. Deosaran, E. et al. NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell Sci.* **126**, 939–952 (2013).
142. Øverbye, A., Brinchmann, M. F. & Seglen, P. O. Proteomic Analysis of Membrane-Associated Proteins from Rat Liver Autophagosomes. *Autophagy* **3**, 300–322 (2007).
143. Johnston, J. A., Ward, C. L. & Kopito, R. R. Aggresomes: A Cellular

- Response to Misfolded Proteins. *J. Cell Biol.* **143**, 1883–1898 (1998).
144. Turco, E. et al. FIP200 Claw Domain Binding to p62 Promotes Autophagosome Formation at Ubiquitin Condensates. *Mol. Cell* **74**, 330–346.e11 (2019).
 145. Ma, X. et al. CCT2 is an aggrephagy receptor for clearance of solid protein aggregates. *Cell* **185**, 1325–1345.e22 (2022).
 146. Yao, R.-Q., Ren, C., Xia, Z.-F. & Yao, Y.-M. Organelle-specific autophagy in inflammatory diseases: a potential therapeutic target underlying the quality control of multiple organelles. *Autophagy* **17**, 385–401.
 147. Houck, S. A. et al. Quality control autophagy degrades soluble ERAD-resistant conformers of the misfolded membrane protein GnRHR. *Mol. Cell* **54**, 166–179 (2014).
 148. Grumati, P. et al. Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *eLife* **6**, e25555 (2017).
 149. Hetz, C., Zhang, K. & Kaufman, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **21**, 421–438 (2020).
 150. Loi, M., Raimondi, A., Morone, D. & Molinari, M. ESCRT-III-driven piecemeal micro-ER-phagy remodels the ER during recovery from ER stress. *Nat. Commun.* **10**, 5058 (2019).
 151. Chiramel, A. I., Dougherty, J. D., Nair, V., Robertson, S. J. & Best, S. M. FAM134B, the Selective Autophagy Receptor for Endoplasmic Reticulum Turnover, Inhibits Replication of Ebola Virus Strains Makona and Mayinga. *J. Infect. Dis.* **214**, S319–S325 (2016).
 152. Martinez, J. et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* **17**, 893–906 (2015).
 153. Herb, M., Gluschko, A. & Schramm, M. LC3-associated phagocytosis - The

- highway to hell for phagocytosed microbes. *Semin. Cell Dev. Biol.* **101**, 68–76 (2020).
154. Sanjuan, M. A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253–1257 (2007).
155. Romao, S. *et al.* Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J. Cell Biol.* **203**, 757–766 (2013).
156. Boya, P. & Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**, 6434–6451 (2008).
157. Johansson, A.-C. *et al.* Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **15**, 527–540 (2010).
158. Leist, M. & Jäättelä, M. Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ.* **8**, 324–326 (2001).
159. Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., von Muhlinen, N., Foeglein, A. & Randow, F. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**, 414–418 (2012).
160. Paz, I. *et al.* Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cell. Microbiol.* **12**, 530–544 (2010).
161. Aits, S. *et al.* Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy* **11**, 1408–1424 (2015).
162. Newlaczyl, A. U. & Yu, L.-G. Galectin-3--a jack-of-all-trades in cancer. *Cancer Lett.* **313**, 123–128 (2011).
163. Barondes, S. H., Cooper, D. N., Gitt, M. A. & Leffler, H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J. Biol. Chem.* **269**, 20807–20810 (1994).
164. Fraiberg, M. & Elazar, Z. A TRIM16-Galactin3 Complex Mediates Autophagy of Damaged Endomembranes. *Dev. Cell* **39**, 1–2 (2016).

165. Skowrya, M. L., Schlesinger, P. H., Naismith, T. V. & Hanson, P. I. Triggered recruitment of ESCRT machinery promotes endolysosomal repair. *Science* **360**, eaar5078 (2018).
166. Jia, J. et al. Galectin-3 Coordinates a Cellular System for Lysosomal Repair and Removal. *Dev. Cell* **52**, 69-87.e8 (2020).
167. Ray, K. et al. Tracking the dynamic interplay between bacterial and host factors during pathogen-induced vacuole rupture in real time. *Cell. Microbiol.* **12**, 545–556 (2010).
168. Dupont, N. et al. Shigella Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. *Cell Host Microbe* **6**, 137–149 (2009).
169. Maier, O., Marvin, S. A., Wodrich, H., Campbell, E. M. & Wiethoff, C. M. Spatiotemporal dynamics of adenovirus membrane rupture and endosomal escape. *J. Virol.* **86**, 10821–10828 (2012).
170. King, R. D., Lubinski, J. M. & Friedman, H. M. Herpes simplex virus type 1 infection increases the carbohydrate binding activity and the secretion of cellular galectin-3. *Arch. Virol.* **154**, 609–618 (2009).
171. Berg, T. O., Strømhaug, E., Løvdal, T., Seglen, O. & Berg, T. Use of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide, a lysosome-disrupting cathepsin C substrate, to distinguish between lysosomes and prelysosomal endocytic vacuoles. *Biochem. J.* **300 (Pt 1)**, 229–236 (1994).
172. Uchimoto, T. et al. Mechanism of apoptosis induced by a lysosomotropic agent, L-Leucyl-L-Leucine methyl ester. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* **4**, 357–362 (1999).
173. Repnik, U. et al. L-leucyl-L-leucine methyl ester does not release cysteine cathepsins to the cytosol but inactivates them in transiently permeabilized lysosomes. *J. Cell Sci.* **130**, 3124–3140 (2017).
174. Gutierrez, M. G. et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG

- and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**, 753–766 (2004).
175. Gharthey-Kwansah, G. *et al.* Autophagy in the control and pathogenesis of parasitic infections. *Cell Biosci.* **10**, 101 (2020).
176. Reggio, A., Buonomo, V. & Grumati, P. Eating the unknown: Xenophagy and ER-phagy are cytoprotective defenses against pathogens. *Exp. Cell Res.* **396**, 112276 (2020).
177. McEwan, D. G. Host-pathogen interactions and subversion of autophagy. *Essays Biochem.* **61**, 687–697 (2017).
178. Pinheiro, R. O. *et al.* Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect.* **11**, 181–190 (2009).
179. Salassa, B. N. & Romano, P. S. Autophagy: A necessary process during the *Trypanosoma cruzi* life-cycle. *Virulence* **10**, 460–469 (2019).
180. Reggiori, F. *et al.* Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* **7**, 500–508 (2010).
181. Lennemann, N. J. & Coyne, C. B. Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy* **13**, 322–332 (2017).
182. Dortet, L. *et al.* Recruitment of the major vault protein by InlK: a *Listeria monocytogenes* strategy to avoid autophagy. *PLoS Pathog.* **7**, e1002168 (2011).
183. Ogawa, M. *et al.* Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* **307**, 727–731 (2005).
184. Schnaith, A. *et al.* *Staphylococcus aureus* Subvert Autophagy for Induction of Caspase-independent Host Cell Death*. *J. Biol. Chem.* **282**, 2695–2706 (2007).

185. Sorbara, M. T. & Girardin, S. E. Emerging themes in bacterial autophagy. *Curr. Opin. Microbiol.* **23**, 163–170 (2015).
186. Boada-Romero, E. et al. TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *EMBO J.* **32**, 566–582 (2013).
187. Dou, Z. et al. Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* **527**, 105–109 (2015).
188. Schulze, R. J., Sathyanarayan, A. & Mashek, D. G. Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* **1862**, 1178–1187 (2017).
189. Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M. & Peter, M. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nat. Cell Biol.* **10**, 602–610 (2008).
190. Vargas, J. N. S., Hamasaki, M., Kawabata, T., Youle, R. J. & Yoshimori, T. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1–19 (2022) doi:10.1038/s41580-022-00542-2.
191. Florey, O. & Overholtzer, M. Autophagy proteins in macroendocytic engulfment. *Trends Cell Biol.* **22**, 374–380 (2012).
192. Florey, O., Kim, S. E., Sandoval, C. P., Haynes, C. M. & Overholtzer, M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1335–1343 (2011).
193. Fletcher, K. et al. The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *EMBO J.* **37**, e97840 (2018).
194. Durgan, J. & Florey, O. Many roads lead to CASM: Diverse stimuli of noncanonical autophagy share a unifying molecular mechanism. *Sci. Adv.* **8**, eabo1274 (2022).
195. Durgan, J. et al. Non-canonical autophagy drives alternative ATG8

- conjugation to phosphatidylserine. *Mol. Cell* **81**, 2031-2040.e8 (2021).
196. Rai, S. *et al.* The ATG5-binding and coiled coil domains of ATG16L1 maintain autophagy and tissue homeostasis in mice independently of the WD domain required for LC3-associated phagocytosis. *Autophagy* **15**, 599–612 (2019).
197. Fischer, T. D., Wang, C., Padman, B. S., Lazarou, M. & Youle, R. J. STING induces LC3B lipidation onto single-membrane vesicles via the V-ATPase and ATG16L1-WD40 domain. *J. Cell Biol.* **219**, e202009128 (2020).
198. Fujita, N. *et al.* Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease and canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **284**, 32602–32609 (2009).
199. Gammoh, N., Florey, O., Overholtzer, M. & Jiang, X. Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex–dependent and –independent autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 144–149 (2013).
200. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* **39**, 207–211 (2007).
201. Boada-Romero, E. *et al.* The T300A Crohn’s disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat. Commun.* **7**, 11821 (2016).
202. Lassen, K. G. *et al.* Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7741–7746 (2014).
203. Bajagic, M., Archna, A., Büsing, P. & Scrima, A. Structure of the WD40-domain of human ATG16L1. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **26**, 1828–1837 (2017).
204. Florey, O., Gammoh, N., Kim, S. E., Jiang, X. & Overholtzer, M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy*

- 11, 88–99 (2015).
205. Hinton, A., Bond, S. & Forgac, M. V-ATPase functions in normal and disease processes. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* **457**, 589–598 (2009).
206. Landolt-Marticorena, C., Williams, K. M., Correa, J., Chen, W. & Manolson, M. F. Evidence that the NH₂ terminus of vph1p, an integral subunit of the V₀ sector of the yeast V-ATPase, interacts directly with the Vma1p and Vma13p subunits of the V₁ sector. *J. Biol. Chem.* **275**, 15449–15457 (2000).
207. Shao, E. & Forgac, M. Involvement of the nonhomologous region of subunit A of the yeast V-ATPase in coupling and in vivo dissociation. *J. Biol. Chem.* **279**, 48663–48670 (2004).
208. Forgac, M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 917–929 (2007).
209. Fedele, A. O. & Proud, C. G. Chloroquine and bafilomycin A mimic lysosomal storage disorders and impair mTORC1 signalling. *Biosci. Rep.* **40**, BSR20200905 (2020).
210. Hooper, K. M. *et al.* V-ATPase is a universal regulator of LC3-associated phagocytosis and non-canonical autophagy. *J. Cell Biol.* **221**, e202105112 (2022).
211. Ulferts, R. *et al.* Subtractive CRISPR screen identifies the ATG16L1/vacuolar ATPase axis as required for non-canonical LC3 lipidation. *Cell Rep.* **37**, 109899 (2021).
212. Xu, Y. *et al.* A Bacterial Effector Reveals the V-ATPase-ATG16L1 Axis that Initiates Xenophagy. *Cell* **178**, 552-566.e20 (2019).
213. Lystad, A. H. *et al.* Distinct functions of ATG16L1 isoforms in membrane binding and LC3B lipidation in autophagy-related processes. *Nat. Cell Biol.* **21**, 372–383 (2019).
214. Goodwin, J. M. *et al.* GABARAP sequesters the FLCN-FNIP tumor suppressor complex to couple autophagy with lysosomal biogenesis. *Sci.*

- Adv.* **7**, eabj2485 (2021).
215. Zhang, X. *et al.* High-protein diets increase cardiovascular risk by activating macrophage mTOR to suppress mitophagy. *Nat. Metab.* **2**, 110–125 (2020).
216. Osonoi, Y. *et al.* Defective autophagy in vascular smooth muscle cells enhances cell death and atherosclerosis. *Autophagy* **14**, 1991–2006 (2018).
217. Li, X. *et al.* Autophagy Reprograms Alveolar Progenitor Cell Metabolism in Response to Lung Injury. *Stem Cell Rep.* **14**, 420–432 (2020).
218. Villella, V. R. *et al.* Autophagy suppresses the pathogenic immune response to dietary antigens in cystic fibrosis. *Cell Death Dis.* **10**, 1–11 (2019).
219. Singh, S. S. *et al.* Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene* **37**, 1142–1158 (2018).
220. Di Leo, L. *et al.* Loss of Ambra1 promotes melanoma growth and invasion. *Nat. Commun.* **12**, 2550 (2021).
221. Rybstein, M. D., Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G. & Galluzzi, L. The autophagic network and cancer. *Nat. Cell Biol.* **20**, 243–251 (2018).
222. Lévy, J. *et al.* Intestinal inhibition of Atg7 prevents tumour initiation through a microbiome-influenced immune response and suppresses tumour growth. *Nat. Cell Biol.* **17**, 1062–1073 (2015).
223. Mukhopadhyay, S. *et al.* Autophagy is required for proper cysteine homeostasis in pancreatic cancer through regulation of SLC7A11. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **118**, e2021475118 (2021).
224. Bryant, K. L. *et al.* Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nat. Med.* **25**, 628–640 (2019).
225. Kimmelman, A. C. & White, E. Autophagy and Tumor Metabolism. *Cell Metab.* **25**, 1037–1043 (2017).
226. Degenhardt, K. *et al.* Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**, 51–64 (2006).

227. White, E., Lattime, E. C. & Guo, J. Y. Autophagy Regulates Stress Responses, Metabolism and Anti-cancer Immunity. *Trends Cancer* **7**, 778–789 (2021).
228. Macintosh, R. L. et al. Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle* **11**, 2022–2029 (2012).
229. Zhan, Z. et al. Autophagy facilitates TLR4- and TLR3-triggered migration and invasion of lung cancer cells through the promotion of TRAF6 ubiquitination. *Autophagy* **10**, 257–268 (2014).
230. Zhou, B. et al. Intestinal Flora and Disease Mutually Shape the Regional Immune System in the Intestinal Tract. *Front. Immunol.* **11**, 575 (2020).
231. James, K. R. et al. Distinct microbial and immune niches of the human colon. *Nat. Immunol.* **21**, 343–353 (2020).
232. Qi, Y.-Y., Zhou, X.-J. & Zhang, H. Autophagy and immunological aberrations in systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* **49**, 523–533 (2019).
233. Yang, G. & Van Kaer, L. Therapeutic Targeting of Immune Cell Autophagy in Multiple Sclerosis: Russian Roulette or Silver Bullet? *Front. Immunol.* **12**, (2021).
234. Igci, M. et al. Gene expression profiles of autophagy-related genes in multiple sclerosis. *Gene* **588**, 38–46 (2016).
235. Mo, J.-J. et al. Genetic association analysis of ATG16L1 rs2241880, rs6758317 and ATG16L2 rs11235604 polymorphisms with rheumatoid arthritis in a Chinese population. *Int. Immunopharmacol.* **93**, 107378 (2021).
236. Vomero, M. et al. Autophagy and Rheumatoid Arthritis: Current Knowledges and Future Perspectives. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
237. Theofani, E. & Xanthou, G. Autophagy: A Friend or Foe in Allergic Asthma? *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 6314 (2021).

238. Barnes, P. J., Baker, J. & Donnelly, L. E. Autophagy in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **136**, 733–746 (2022).
239. Yao, D., GangYi, Y. & QiNan, W. Autophagic dysfunction of β cell dysfunction in type 2 diabetes, a double-edged sword. *Genes Dis.* **8**, 438–447 (2021).
240. Ilyas, G. et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β . *J. Hepatol.* **64**, 118–127 (2016).
241. Tanaka, S. et al. Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice. *Hepatol. Baltim. Md* **64**, 1994–2014 (2016).
242. He, C. et al. Beclin 2 Functions in Autophagy, Degradation of G Protein-Coupled Receptors, and Metabolism. *Cell* **154**, 1085–1099 (2013).
243. Baerga, R., Zhang, Y., chen, po-H., Goldman, scott & Jin, shengkan. Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**, 1118–1130 (2009).
244. Singh, R. et al. Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 3329–3339 (2009).
245. Kaushik, S. et al. Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance. *Cell Metab.* **14**, 173–183 (2011).
246. Altshuler-Keylin, S. et al. Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab.* **24**, 402–419 (2016).
247. Wrighton, K. H. Mitophagy turns beige adipocytes white. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 607–607 (2016).
248. Lu, X. et al. Mitophagy controls beige adipocyte maintenance through a Parkin-dependent and UCP1-independent mechanism. *Sci. Signal.* **11**, eaap8526 (2018).

249. Corcelle-Termeau, E. *et al.* Excess sphingomyelin disturbs ATG9A trafficking and autophagosome closure. *Autophagy* **12**, 833–849 (2016).
250. Choi, I. *et al.* Microglia clear neuron-released α -synuclein via selective autophagy and prevent neurodegeneration. *Nat. Commun.* **11**, 1386 (2020).
251. Nakamura, S. *et al.* Suppression of autophagic activity by Rubicon is a signature of aging. *Nat. Commun.* **10**, 847 (2019).
252. Selkoe, D. J. & Schenk, D. Alzheimer's Disease: Molecular Understanding Predicts Amyloid-Based Therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584 (2003).
253. Heckmann, B. L. *et al.* LC3-Associated Endocytosis Facilitates β -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell* **178**, 536-551.e14 (2019).
254. Caballero, B. *et al.* Acetylated tau inhibits chaperone-mediated autophagy and promotes tau pathology propagation in mice. *Nat. Commun.* **12**, 2238 (2021).
255. Zheng, S. *et al.* Deletion of the Huntingtin Polyglutamine Stretch Enhances Neuronal Autophagy and Longevity in Mice. *PLOS Genet.* **6**, e1000838 (2010).
256. Nilsson, P. *et al.* $A\beta$ Secretion and Plaque Formation Depend on Autophagy. *Cell Rep.* **5**, 61–69 (2013).
257. Palacino, J. J. *et al.* Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage in parkin-deficient Mice *. *J. Biol. Chem.* **279**, 18614–18622 (2004).
258. Gautier, C. A., Kitada, T. & Shen, J. Loss of PINK1 causes mitochondrial functional defects and increased sensitivity to oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 11364–11369 (2008).
259. Kitada, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605–608 (1998).

260. Khaminets, A. *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* **522**, 354–358 (2015).
261. Song, N. & Li, T. Regulation of NLRP3 Inflammasome by Phosphorylation. *Front. Immunol.* **9**, 2305 (2018).
262. Deretic, V. & Levine, B. Autophagy balances inflammation in innate immunity. *Autophagy* **14**, 243–251 (2018).
263. Van Limbergen, J., Radford-Smith, G. & Satsangi, J. Advances in IBD genetics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 372–385 (2014).
264. Sairenji, T., Collins, K. L. & Evans, D. V. An Update on Inflammatory Bowel Disease. *Prim. Care* **44**, 673–692 (2017).
265. Neurath, M. F. Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 76–77 (2020).
266. Sasson, A. N., Ananthakrishnan, A. N. & Raman, M. Diet in Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **19**, 425-435.e3 (2021).
267. Schroeder, B. O. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol. Rep.* **7**, 3–12 (2019).
268. Wu, Y. *et al.* The role of autophagy in maintaining intestinal mucosal barrier. *J. Cell. Physiol.* **234**, 19406–19419 (2019).
269. Han, C. *et al.* FoxO1 regulates TLR4/MyD88/MD2-NF- κ B inflammatory signalling in mucosal barrier injury of inflammatory bowel disease. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 3712–3723 (2020).
270. Ramos, G. P. & Papadakis, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. *Mayo Clin. Proc.* **94**, 155–165 (2019).
271. Alcalá, S., Klee, M., Fernández, J., Fleischer, A. & Pimentel-Muiños, F. X. A high-throughput screening for mammalian cell death effectors identifies the mitochondrial phosphate carrier as a regulator of cytochrome c release. *Oncogene* **27**, 44–54 (2008).

272. Serramito-Gómez, I. *et al.* Regulation of cytokine signaling through direct interaction between cytokine receptors and the ATG16L1 WD40 domain. *Nat. Commun.* **11**, 5919 (2020).
273. Gerlach, J. P. *et al.* TMEM59 potentiates Wnt signaling by promoting signalosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E3996–E4005 (2018).
274. Ullrich, S. *et al.* The Novel Membrane Protein TMEM59 Modulates Complex Glycosylation, Cell Surface Expression, and Secretion of the Amyloid Precursor Protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 20664–20674 (2010).
275. Catalan-Dibene, J., McIntyre, L. L. & Zlotnik, A. Interleukin 30 to Interleukin 40. *J. Interferon Cytokine Res.* **38**, 423–439 (2018).
276. Lin, J.-X. & Leonard, W. J. The Common Cytokine Receptor γ Chain Family of Cytokines. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, a028449 (2018).
277. Jia, H., Liu, J. & Han, B. Reviews of Interleukin-37: Functions, Receptors, and Roles in Diseases. *BioMed Res. Int.* **2018**, 3058640 (2018).
278. Mertowska, P., Mertowski, S., Smarz-Widelska, I. & Grywalska, E. Biological Role, Mechanism of Action and the Importance of Interleukins in Kidney Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 647 (2022).
279. Wang, X., Lupardus, P., LaPorte, S. L. & Garcia, K. C. Structural Biology of Shared Cytokine Receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 29–60 (2009).
280. Renauld, J.-C. Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 667–676 (2003).
281. Ve, T., Williams, S. J. & Kobe, B. Structure and function of Toll/interleukin-1 receptor/resistance protein (TIR) domains. *Apoptosis* **20**, 250–261 (2015).
282. Radons, J., Falk, W. & Dove, S. Identification of critical regions within the TIR domain of IL-1 receptor type I. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **68**, 15–20 (2015).
283. Slack, J. L. *et al.* Identification of two major sites in the type I interleukin-1

- receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 4670–4678 (2000).
284. Vyncke, L. *et al.* Reconstructing the TIR Side of the Myddosome: a Paradigm for TIR-TIR Interactions. *Structure* **24**, 437–447 (2016).
285. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* **282**, 2085–2088 (1998).
286. Radons, J. *et al.* Identification of essential regions in the cytoplasmic tail of interleukin-1 receptor accessory protein critical for interleukin-1 signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 16456–16463 (2002).
287. Eskelinen, E.-L. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* **27**, 495–502 (2006).
288. Nordenfelt, P., Grinstein, S., Björck, L. & Tapper, H. V-ATPase-mediated phagosomal acidification is impaired by *Streptococcus pyogenes* through Mga-regulated surface proteins. *Microbes Infect.* **14**, 1319–1329 (2012).
289. Lu, S.-L. *et al.* Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*. *PLOS Pathog.* **13**, e1006444 (2017).

ANEXOS

ANEXO I – OLIGONUCLEÓTIDOS PARA PCR

Denominación	Secuencia
IL-1RAP-M1-F420, L423 to A-TOP	GGAATGCGGAAGAAGAAGAAGCTGTATTAGCGACCCTCCGTG GAGTTTTGGAG
IL-1RAP-M1-F420, L423 to A-BOTT	CTCCAAAACCTCCACGGAGGGTCGCTAATACAGCTTCTTCTTCTT CCGCATTCC
IL-1RAP-M1-I407, Y408, Y411 to A-TOP	TTAGATGGAAAAGAGTATGATGCTGCTGTATCCGCTGCAAGGA ATGCGGAAGAAGAAG
IL-1RAP-M1-I407, Y408, Y411 to A-BOTT	CTTCTTCTTCCGCATTCTTGCAGCGGATACAGCAGCATCATAC TCTTTTCCATCTAA
IL-1RAP-Y533, G536 to A-TOP	GAAAGGGGAAAAATCCAAGGCTCCACAGGCCAGGTTCTGGAA GCAGCTGC
IL-1RAP-Y533, G536 to A-BOTT	GCAGCTGCTTCCAGAACCTGGCCTGTGGAGCCTTGGATTTTTCC CCTTTC
IL-1RAP-L521, I524, W526 to A-TOP	CTGAAGAGGGCTAAGACGGTGGCCACGGTCGCTAAAGCGAAA GGGGAAAAATCCAAGGCTC
IL-1RAP-L521, I524, W526 to A-BOTT	GAGCCTTGGATTTTTCCCCTTTCGCTTTAGCGACCGTGGCCACC GTCTTAGCCCTCTCAG
IL-12RB2-M2-L763, Y767, L770 to A-TOP	CTCCAAGCTGAGAGCAGACAAGCGGTGGATCTGGCCAAGGTG GCGGAGAGCAGGGGCTCCGACCC
IL-12RB2-M2-L763, Y767, L770 to A-BOTT	GGGTCGGAGCCCCTGCTCTCCGCCACCTTGGCCAGATCCACC GCTTGTCTGCTCTCAGCTTGGG
IL-12RB2-M1-F718, P721 to A-TOP	CATCAAGTGACCCCAGTTGCCAGACATGCCCCCTGCTCCAAC GGCCAC

IL-12RB2-M1-F718, P721 to A-BOTT	GTGGCCAGTTGGAGCAGGGGGCATGTCTGGCAACTGGGGTCA CTTGATG
IL-12RB2-M1-L705, I707 to A-TOP	CGCCTGAAGATCCTGAACCGGCGGTCCGAGTGAAGTCCTTCA TCAAGTG
IL-12RB2-M1-L705, I707 to A-BOTT	CACTTGATGAAGGACTTCACTGGCGACCGCCGGTTCAGGATCT TCAGGCG
IL-18R1-A354D, I350A-TOP	GTGCCTAGTGACTGTGTGTGTCGCTGCTAGAGTTGACTTGGTTC TAGCTGCTAGAC
IL-18R1-A354D, I350A-BOTT	GTCTAGCAGCTAGAACCAAGTCAACTCTAGCAGCGACACACAC AGTCACTAGGCAC
IL-18R1-F358, Y359, L362 to A-TOP	TTATAGAGTTGACTTGGTTCTAGCTGCTAGACATGCAACGAGAA GAGATGAAACATTAAC
IL-18R1-F358, Y359, L362 to A-BOTT	GTTAATGTTTCATCTCTTCTCGTTGCATGTCTAGCAGCTAGAACC AAGTCAACTCTATAA
IL-18R1-Y351, D354 to A-TOP	GTGACTGTGTGTGTCATTGCTAGAGTTGCCTTGGTTCTAGCTGC TAGAC
IL-18R1-Y351, D354 to A-BOTT	GTCTAGCAGCTAGAACCAAGGCAACTCTAGCAATGACACACAC AGTCAC
IL-18RAP-Y392,Y395 to A-TOP	GATTGAAATAGTGCTGCTGGCCCGGACCGCCAGAGCAAGGA TCAGACGC
IL-18RAP-Y392,Y395 to A-BOTT	GCGTCTGATCCTTGCTCTGGGCGGTCCGGGCCAGCAGCACTAT TTCAATC
IL-18RAP-Y382, W385, E387 to A-TOP	CTGGCGGCGAGTGCCCTCCTCGCCAGGCACGCGATTGCGATA GTGCTGCTGGCCCGGACCGCC
IL-18RAP-Y382, W385, E387 to A-BOTT	GGCGGTCCGGGCCAGCAGCACTATCGCAATCGCGTGCCTGGC GAGGAGGGCACTCGCCGCCAG

IL-18RAP-L380, L381 to A, A387E-TOP	GCCGTGCTGGCGGCGAGTGCCGCCGCCAGGCACGCGAT TGAAATAGTGCTGCTGGCCCCGGACC
IL-18RAP-L380, L381 to A, A387E-BOTT	GGTCCGGGCCAGCAGCACTATTTCAATCGCGTGCCTGGCGGC GGCGGCACTCGCCGCCAGCACGGC
IL-31RA-M1-W555A- TOP	CAAATTGACTCATCTGTGTGCCCCCACCGTTCCCAACCCTG
IL-31RA-M1-W555A- BOTT	CAGGGTTGGGAACGGTGGGGGCACACAGATGAGTCAATTTG
IL-31RA-M1-W569, D572 to A-TOP	CTGAAAGTAGTATAGCCACAGCGCATGGAGCTGATTTCAAGGA TAAGCTAAAC
IL-31RA-M1-W569, D572 to A-BOTT	GTTTAGCTTATCCTTGAAATCAGCTCCATGCGCTGTGGCTATAC TACTTTCAG
IL-31RA-L603A-TOP (3M)	CCACCCCCAGTGACAAGGCGGTGATTGACAAGTTGGTG
IL-31RA-L603A-BOTT (3M)	CACCAACTTGTC AATCACCGCCTTG TCACTGGGGGTGG
IL-31RA-I605, L607 to A-TOP	CCCCCAGTGACAAGGCGGTGGCTGACAAGGCTGTGGTGAACG CTGGGAATG
IL-31RA-I605, L607 to A-BOTT	CATTCCCAGCGTTCACCACAGCCTTGTCAGCCACCGCCTTGTC A CTGGGGG
IL-31RA-F612A; V615A-TOP	GACAAGTTGGTGGTGAACGCTGGGAATGCTCTGCAAGAAATTT TCACAGATG
IL-31RA-F612A; V615A-BOTT	CATCTGTGAAAATTTCTTGCAGAGCATTCCCAGCGTTCACCACC AACTTGTC
IL-31RA-L616, E623 to A-TOP	GTGGTGAACGCTGGGAATGCTGCTCAAGAAGCTGCCACAGAT GCGGCCAGAACGGGT CAGGAAAC

IL-31RA-L616,E623 to A-BOTT	GTTTTCTGACCCGTTCTGGCCGCATCTGTGGCAGCTTCTTGAG CAGCATTCCCAGCGTTCACCAC
IL-31RA-F620A-TOP (4M)	GAATGCTCTGCAAGAAATTGCCACAGATGAAGCCAGAACG
IL-31RA-F620A-BOTT (4M)	CGTTCTGGCTTCATCTGTGGCAATTTCTTGACAGAGCATT
IL-31RA-L616, E623, I619 to A-TOP	GTGGTGAACGCTGGGAATGCTGCTCAAGAAGCTGCCACAGAT GCGGCCAGAACGGGTCAGGAAAAC
IL-31RA-L616, E623, I619 to A-BOTT	GTTTTCTGACCCGTTCTGGCCGCATCTGTGGCAGCTTCTTGAG CAGCATTCCCAGCGTTCACCAC
IL-33R-Y368, R371 to A-TOP	GAGAGACATAGCTAAACCTGCCAAGACTGCGAATGATGGAAAG CTCTATG
IL-33R-Y368, R371 to A-BOTT	CATAGAGCTTTCCATCATTGCGAGTCTTGGCAGGTTTAGCTATG TCTCTC
IL-33R-L359, L360, W361 to A-TOP	GTTCTGGATTGAGGCCACTGCCGCCGCGAGAGACATAGCTAAA CCTGCCAAGAC
IL-33R-L359, L360, W361 to A-BOTT	GTCTTGGCAGGTTTAGCTATGTCTCTCGCGGCGGCAGTGGCCT CAATCCAGAAC
IL-33R-F353, W354, I355 to A-TOP	CTGGTTATCATCCTAAAAATGGCCGCGGCTGAGGCCACTGCCG CCGCGAGAGAC
IL-33R-F353, W354, I355 to A-BOTT	GTCTCTCGCGGCGGCAGTGGCCTCAGCCGCGGCCATTTTTAGG ATGATAACCAG
IL-10RB-F292-L295A- TOP	GTCGGATGAGAATGATGTTGCTGACAAGGCAAGTGTCATTGCA GAAGAC
IL-10RB-F292-L295A- BOTT	GTCTTCTGCAATGACACTTGCCTTGTGAGCAACATCATTCTCATC CGAC

IL-10RB-F280,81,83A- TOP	CTCATCATAACACACTTCTGGCTGCCTCCGCTCCATTGTCCGGAT GAGAATGATG
IL-10RB-F280,81,83A- BOTT	CATCATTCTCATCCGACAATGGAGCGGAGGCAGCCAGAAGTGT GTTATGATGAG
IL-2Rg-F307, W310 to A-TOP	GTTACTGAATACCACGGGAACGCTTCGGCCGCCAGTGGTGTGT CTAAGGGAC
IL-2Rg-F307, W310 to A-BOTT	GTCCCTTAGACACACCACTGGCGGCCGAAGCGTTCCCGTGGTA TTCAGTAAC
IL-2Rg-L296, L299, Y303 to A-TOP	CGAATTCCCACCCTGAAGAACGCAGAGGATGCTGTTACTGAAG CCCACGGGAACGCTTCGGCCGCC
IL-2Rg-L296, L299, Y303 to A-BOTT	GGCGGCCGAAGCGTTCCCGTGGGCTTCAGTAACAGCATCCTCT GCGTTCTTCAGGGTGGGAATTCG
IL18R-Eco-Kz-fw	GGGCCCCGAATTCGCCACCATGAATTGTAGAGAATTACCCTTGA CCC
IL18R1-K514-Bsph- REV	CCCGGGTCATGACCTTCCAGAACCTTGAGTTATAAGAAAG
IL18R1-S494-Bsph- REV	CCCGGGTCATGACAGATTTCAAAGCTTTAGTGATTGGGG
IL18R1-V465-Bsph- REV	CCCGGGTCATGACCACCAATGCTTCATGGAGTCCACTTTC
IL18R1-L443-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACTAGGACAATGATTAGTCTTCGGCTTTTC
IL18R1-P401-Bsph- REV	CCCGGGTCATGACGGGCAAATCTCCACAGCAAAGGTGTG
IL18R1-R386-Bsph- REV	CCCGGGTCATGACTCGGCATTCTTTTAGGTAAGACACAAAAG

IL18R1-V353-deltaID-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACAACCTCTATAAATGACACACACAGTCAC
IL-33R-Hind3-Kz-fw	GGGCCCAAGCTTGCCACCATGGGGTTTTGGATCTTAGCAATTCT CAC
IL-33R-P538-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACTGGCACAGGCATTTGGTACCTCACGTG
IL-33R-K505-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACTTTCATAAGATGCTGGAGGGAGTCCTG
IL-33R-L466-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACCAGGGCAACCTCCTGCTCGTAGGCAAAC
IL-33R-L448-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACCAGGATGAAAATGTGCCGCCTGCTCTTTC
IL-33R-K412-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACTTTATTTTCAAGAACATCAGGCAGAATC
IL-33R-N386-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACGTTCCGTGGGTAGACAACATAAGCATC
IL33R-deltaID-M352-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACCATTTTTAGGATGATAACCAGGACATTG
IL18RAP-Hind3-Kz-fw	GGGCCCAAGCTTGCCACCATGCTCTGTTTGGGCTGGATATTCT TTGGC
IL-18RAP-K562-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACTTTCACAGGCATGTGGTAGCGCATTTTG
IL-18RAP-K513-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACCTTAATTAATAAATGAGTTTCAGTGTTTG
IL-18RAP-N444-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACGTTTTCTAAAACATCAGGAAATAGGCTC
IL-18RAP-E423-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACCTCACTTGGAAAAGAGCTCCATTTTGC
IL18RAP-L380-deltaID-Bsph-REV	CCCGGGTCATGACGAGGGCACTCGCCGCCAGCACGGCCAC

GST-Mlu-SGG-fw	GGGCCCACGCGTAGCGGCGGCATGTCCCCTATACTAGGTTATT GG
AIR-Bam-TM-962-fw	GGGCCC GGATCCCTCTGGGTGGATTTAACTACA ACTCTTG
p8-seq-3952rev	CAGACCTGAGGAAGAGATGG
P8-seq-2751fw	AGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT
AIR-Bam-GG-G239-rev	CCCGGGGGATCCCCCCAGAGTTAAGAGAGAGGCATCT
AIR-delta TA281-TOP	CTTTGGATTTGTTGTGCAACTGTTGCTTTTATGAATGAACAAAAG CTAAACAG
AIR-delta TA281- BOTT	CTGTTTAGCTTTTGTTCATTCATAAAAAGCAACAGTTGCACAACAA ATCCAAAG

ANEXO II – ANTICUERPOS PRIMARIOS

Anticuerpo	Especie	Especificidad	Aplicación	Dilución	Casa comercial	Referencia
α -ATP6-V ₀ C	Conejo	Policlonal	WB	1:1000	St Johns Lab	STJ118778
α -ATP6-V ₁ A	Conejo	Monoclonal	WB	1:1000	Abcam	ab199326
α -ATG16L1	Ratón	Monoclonal	WB	1:2000	MBL Life Science	M150-3
α -AU	Conejo	Policlonal	WB	1:1000	Thermo Scientific	PA1-26548
α -FLAG	Conejo	Monoclonal	WB/IP	1:1000/1:250	Cell Signaling Technology	#2368
α -FLAG	Ratón	Monoclonal	WB/IP	1:1000/1:250	Sigma-Aldrich	F3165
α -GAPDH	Ratón	Monoclonal	WB	1:10000	Abcam	ab8245
α -GST	Conejo	Policlonal	WB	1:1000	Cell Signaling Technology	2622
α -GST	Ratón	Monoclonal	WB	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-138
α -HA	Ratón	Monoclonal	WB	1:1000	BioLegend	901501
α -HA	Conejo	Monoclonal	WB	1:1000	Cell Signaling Technology	#3724
α -TMEM59 (AP3)	Pollo	Policlonal	IP	1:250	Generado en el laboratorio. Purificación por afinidad	
α -TMEM59 (AP9)	Conejo	Policlonal	WB	1:3000	Generado en el laboratorio. Purificación por afinidad	

ANEXO III – ANTICUERPOS SECUNDARIOS

Anticuerpo	Conjugación y especie	Reactividad	Aplicación y dilución	Casa comercial	Referencia
HRP-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	HRP Cabra	Conejo IgG (H+L)	WB 1:10000	Jackson ImmunoResearch	111-035-003
HRP-conjugated AffiniPure Goat anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	HRP Cabra	Pollo IgG (H+L)	WB 1:10000	Jackson ImmunoResearch	103-035-155
HRP-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L)	HRP Cabra	Ratón IgG (H+L)	WB 1:10000	Jackson ImmunoResearch	115-035-003

