



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**LA FALTA DE NUTRIENTES CAMBIA LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA  
ERV14 DE LAS VESÍCULAS COPII AL AUTOFAGOSOMA**

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I O L O G O**

**P R E S E N T A:**

**NAYELI IMELDA ROLDAN RAMÍREZ**

**DIRECTOR**

**DR. PAUL ROSAS SANTIAGO**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**OCTUBRE, 2021**

Dedico esta tesis a mis padres Antonia Ramírez Pastrana y Juan Roldan Sarabia que siempre me apoyaron incondicionalmente moral y económicamente para terminar mi carrera universitaria y lograr el título de bióloga.

Este trabajo fue realizado bajo la dirección del Dr. Paul Rosas Santiago en el departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del proyecto DGAPA a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA200619.

## **AGRADECIMIENTOS**

En esta etapa importante de mi vida, quiero extender un profundo agradecimiento a quienes me acompañaron en este camino en todo momento y siempre fueron mi apoyo y fortaleza. Esta mención en especial es para mi familia que siempre está cuando los necesito.

Mi gratitud también a mi director de tesis Dr. Paul Rosas Santiago por su apoyo, paciencia y enseñanza para realizar este gran proyecto de tesis.

Agradezco a los miembros del jurado:

M. en C. Laura Patricia Lina García.

Dr. Ramón Suárez Rodríguez.

Dra. María Luisa Castrejón Godínez.

M. en C. María Luisa Barroso García.

Por el interés, motivación, apoyo y crítica, necesarios para la realización de este trabajo. Un especial agradecimiento por su gran interés en mi desarrollo profesional.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN .....	9
2. MARCO TEÓRICO .....	11
2.1 Autofagia.....	11
2.2 Mecanismo molecular de la autofagia.....	15
2.3 Ruta secretoria.....	19
2.4 Complejo de proteínas de la cubierta tipo II: transporte mediado por vesículas de la vía anterógrada del RE al aparato de Golgi .....	22
2.5 Receptores de proteína cargo.....	27
2.6 Receptor de proteína cargo: Erv14 .....	30
2.7 Modelo de estudio: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	32
2.8 La membrana del autofagosoma requiere de varios organelos incluyendo las vesículas COPII .....	34
3. JUSTIFICACIÓN .....	36
4. HIPÓTESIS .....	36
5. OBJETIVOS.....	37
5.1 Objetivo general.....	37
5.2 Objetivos específicos .....	37
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	38
6.1 Transformaciones rápidas de levadura con Acetato de Litio.....	38
6.2 Microscopía de fluorescencia confocal .....	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1 La localización de Erv14 cambia debido a la falta de nutrientes.....	41
8. DISCUSIÓN .....	49

9. CONCLUSIÓN .....	54
10. PERSPECTIVAS .....	55
10.1 Demostrar si el cambio de localización de Erv14 corresponde a estructuras del autofagosoma .....	55
10.2 Determinar si Erv14 interactúa con proteínas del autofagosoma durante la falta de nutrientes .....	55
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. El transporte bidireccional entre el ER y el Golgi está mediado por COPI y COPII.....</i>	<i>21</i>
<i>Figura 2. Bidireccionalidad de la ruta secretora.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 3. La estructura de COPII facilita el transporte de carga diversa. ....</i>	<i>25</i>
<i>Figura 4. Fuentes de membrana para fagóforos. ....</i>	<i>35</i>
<i>Figura 5. Mapa del plásmido Erv14-GFP (pERV14-GFP). ....</i>	<i>39</i>
<i>Figura 6. Erv14 cambia su localización durante el tiempo en ausencia de glucosa o nitrógeno.....</i>	<i>44</i>
<i>Figura 7. La localización de Erv14-GFP en medio mínimo disminuyó en el AG a las 5 h de incuación. ....</i>	<i>45</i>
<i>Figura 8. La localización de Erv14-GFP en medio sin glucosa parece estar en el PAS.46</i>	
<i>Figura 9. La localización en de Erv14-GFP en medio sin nitrógeno está en el RE y en la vacuola. ....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 10. La localización de Erv14-GFP en medio sin nitrógeno y glucosa mostró menor fluorescencia. ....</i>	<i>48</i>

## RESUMEN

La autofagia es un mecanismo celular que permite a las células contender contra diferentes tipos de estrés. Este mecanismo es importante para poder degradar material perteneciente a los organelos subcelulares o estar focalizada en regiones especializadas del retículo endoplásmico. El proceso autofágico requiere que una estructura denominada autofagosoma crezca para englobar el material a degradar y para lograr esto se requiere un incremento en la membrana del autofagosoma. Varios organelos son los que abastecen de membrana al autofagosoma. Las vesículas COPII se han identificado como una importante fuente de membrana para el autofagosoma, las cuales de manera habitual participan dentro del tráfico vesicular en la ruta secretoria convencional para transportar proteínas desde el retículo endoplásmico hacia el aparato de Golgi. Varias son las proteínas que estructuran a las vesículas COPII, siendo la proteína Erv14 importante para la selección de proteínas cargos en el retículo endoplásmico. Los resultados de esta tesis muestran que la proteína Erv14 fusionada en su carboxilo terminal a la proteína verde fluorescente GFP se moviliza del retículo endoplásmico a la vacuola cuando existe una deficiencia de algún nutriente como la glucosa o el nitrógeno. Estos resultados nos permiten proyectar el posible papel de Erv14 dentro de la autofagia.

## 1. INTRODUCCIÓN

La autofagia es un mecanismo central que la célula, entre otras funciones, usa cuando se encuentra en un ambiente de estrés por ayuno (falta de nutrientes esenciales), y que responde a señales muy finas sobre los requerimientos celulares (por ejemplo, la disponibilidad de aminoácidos o fuentes de carbono) y sus opciones de desarrollo y supervivencia. Este proceso permite a la célula adquirir sus propios nutrientes mediante el reciclaje de proteínas que se degradan en la vacuola, de dónde obtendrá los componentes necesarios para mantener el proceso autocatalítico de la célula. El proceso de la autofagia inicia con la formación de los autofagosomas, los cuales son estructuras de doble membrana y se encargan de encapsular el material a degradar. Se ha reportado que tanto la membrana plasmática, las mitocondrias y el retículo endoplásmico (RE) pueden ceder sus membranas para dar origen a la doble membrana que caracteriza a los autofagosomas (Choi *et al.*, 2018).

Otra fuente de membrana para los autofagosomas son las vesículas tipo COPII (Shima *et al.*, 2019). Estas vesículas pertenecen a la ruta secretoria anterógrada y en condiciones normales de crecimiento forman parte de una ruta por la cual las proteínas sintetizadas (proteínas cargo) en el RE dejan este organelo a través de su empaquetamiento dentro de las vesículas para posteriormente dirigirse al aparato de Golgi (AG). Posteriormente las proteínas cargo serán procesadas en el AG para finalmente salir hacia su destino, que en algunos casos son para que se anclen en la membrana plasmática, o de ser el caso secretadas hacia el espacio extracelular o también dirigirse hacia otros organelos subcelulares (Shima *et al.*, 2019).

Hasta ahora, se desconoce qué sucede con las proteínas que integran a las vesículas COPII como lo son Sec13-Sec31, Sec24-Sec25, Sar1 y Erv14 (Barlowe y Miller., 2013) durante su proceso de incorporación al autofagosoma, es decir, si son degradadas como cualquier componente más en esta ruta o contribuyen de algún modo al proceso

de la ruta autofágica. Dentro de las proteínas anteriormente mencionadas, Erv14 tiene una función como receptor de proteínas cargo ya que reconoce y selecciona a una gran cantidad de proteínas de membrana (Herzig *et al.*, 2012). Recientemente se mostró que la proteína cargo Axl2 necesita de Erv14 para localizarse en el autofagosoma cuando células de levadura son incubadas en rapamicina, la cual es un activador de la autofagia. Debido a estos hallazgos se cree que es posible que Erv14 tenga una participación en la autofagia, ya sea transportando las proteínas cargo con mayor eficiencia hacia el autofagosoma o ayudando de alguna forma a expandir la membrana del autofagosoma.

El objetivo de este proyecto es determinar si durante la falta de nutrientes, como la glucosa o el nitrógeno, la localización de Erv14 cambia de las vesículas COPII al autofagosoma. Para ello se determinó si la localización de Erv14 cambia de condiciones normales de crecimiento respecto al ayuno.

También se plantea la posibilidad de que debido a que Erv14 es una proteína de membrana inmersa en la membrana de las vesículas COPII, este receptor de proteínas cargo interactúe con algunos componentes de la membrana del autofagosoma durante la activación de la autofagia, y que esto ayude al proceso autofagico.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Autofagia

La autofagia es un proceso celular que está presente en células eucariotas, la cual consiste en la encapsulación de orgánulos, proteínas y lípidos dentro de las vesículas de doble membrana llamados autofagosomas. Estas estructuras de doble membrana se fusionarán con la membrana de los lisosomas o de la vacuola para la degradación de la materia destinada a degradación (Yang y Klionsky, 2010).

El investigador Yoshinori Ohsumi estudió la autofagia utilizando como sistema modelo a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ya que la vacuola de la levadura es el homólogo funcional de los lisosomas. Descubrió que los autofagosomas se acumulaban en la vacuola si a las levaduras se las cultivaba en medios carentes de nutrientes (Takehige Baba, 1992). Los resultados mostraron que la autofagia es una respuesta celular utilizada para la supervivencia durante la falta de nutrientes. Un defecto en la autofagia resulta en la pérdida de viabilidad celular durante la inanición, lo que indica que la degradación de macromoléculas (lípidos, polisacáridos o polipéptidos) proporciona los nutrientes mínimos necesarios para que las células hambrientas sobrevivan durante el periodo de inanición (Tsukada y Ohsumi, 1993).

La estructura del autofagosoma posee una forma de copa de doble membrana envuelta en una región del citosol o de algún orgánulo como por ejemplo la mitocondria, el AG o el RE de donde se ha visto que toma la membrana para crecer y expandirse. Una vez que el autofagosoma se encuentra con el lisosoma, su membrana externa se fusiona con la del lisosoma formando una membrana grande constituida por una bicapa de membrana simple en el interior del lisosoma, liberando así su contenido al lumen lisosomal. Posteriormente las permeasas de aminoácidos en la membrana del lisosoma

posibilitan el transporte de los aminoácidos libres así generados nuevamente hacia el citosol para ser usados en la síntesis de nuevas proteínas (Lodish *et al.*, 2016).

En *Drosophila melanogaster* y en *Mus musculus* se desarrollaron varios experimentos que mostraron que la autofagia participa en un tipo de control de calidad que elimina organelos no funcionales para la célula. Otros estudios abren la posibilidad de que, a través de la autofagia en cierto tipo de células, las bacterias patógenas y los virus que se multiplican en el citosol de la célula hospedera puedan ser digeridos por la vía autofagica con el fin de ser destruidos en el lisosoma como parte del mecanismo de la célula (Lodish *et al.*, 2016).

La autofagia ha sido estudiada ampliamente, mostrando que alteraciones en su desarrollo normal origina diferentes trastornos humanos comunes como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas y musculares, así como trastornos infecciosos, entre otros (Mehrpour *et al.*, 2010; Mizushima *et al.*, 2008). Otros estudios muestran que la autofagia es esencial para la diferenciación de muchos tipos de células, incluidos los adipocitos, los eritrocitos, los linfocitos y las neuronas (Mizushima y Levine, 2010).

En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de la macroautofagia, a la que nos referiremos comúnmente como “autofagia” a partir de ahora. La macroautofagia consiste en la formación de una membrana de aislamiento que secuestra una porción del citoplasma, conteniendo macromoléculas u organelos subcelulares para su degradación. A través de varias investigaciones se logró conocer que varios genes codifican para las proteínas que participan en la autofagia, mejor conocidos en la literatura como ATG (Autophagy related gene). Estas proteínas se activan ante un estímulo (inducción) para reconocer a la materia a degradar para posteriormente empaquetar a las macromoléculas u organelos dentro del autofagosoma. Los estudios sobre la autofagia muestran que el sitio que da origen a la formación del autofagosoma se denomina ensamblaje del fagóforo (PAS phagophore assembly site) o pre-autofagosoma (Gil *et al.*, 2017). Esta membrana de aislamiento del PAS crece y

engloba el material a degradar, además tiene la peculiaridad de estar constituido por doble membrana. Posterior a su generación y una vez encapsulado el material a degradar, el autofagosoma se dirige al lisosoma/vacuola. La degradación mediante macroautofagia es un proceso no selectivo y al contrario a la degradación que tiene lugar en el sistema ubiquitina-proteasoma (el cual marca a las proteínas a degradar), en la macroautofagia no solo se degradan proteínas, sino material celular de todo tipo ya que se han descrito procesos de autofagia más específicos en las mitocondrias (mitofagia) en donde este proceso sucede para que la biogénesis mitocondrial y la capacidad de la generación de ATP celular se garantice mediante mitocondrias sanas al eliminar las mitocondrias dañadas. Estudios recientes demuestran que la cinasa AMPK fosforila y se une a ULK1 (quinasa 1 activadora de la autofagia) siendo ésta una cinasa clave para el proceso de la mitofagia (Gil *et al.*, 2017), pexofagia (Sakai *et al.*, 2006; eliminación de los peroxisomas), ribofagia (Kraft *et al.*, 2008; eliminación de los ribosomas). Otras investigaciones muestran que existe la autofagia mediada por chaperonas, lo cual muestra que la autofagia también ocurre de manera selectiva ya que en este caso las proteínas a degradar poseen un pentapéptido específico con lo cual son seleccionadas y dirigidas para su degradación (Gil *et al.*, 2017).

También se ha observado que existe un nivel basal de la autofagia en condiciones normales, por consiguiente, esto revela que durante todo momento la autofagia está activa y degrada material para su reciclamiento (Gil *et al.*, 2017).

Otros estudios muestran que la autofagia es un proceso que regula el crecimiento celular, el equilibrio del ambiente dentro del intestino en mamíferos y en el desarrollo de la célula, así como también influye en la respuesta inmune contra agentes infecciosos. Cuando la autofagia funciona adecuadamente recicla macromoléculas y los organelos subcelulares dañados o envejecidos, de esta manera la fusión de los autofagosomas con los lisosomas y su posterior degradación proteolítica genera la reutilización de estas macromoléculas manteniendo la homeostasis celular y un correcto balance energético. Por lo que la autofagia ayuda a que la célula encuentre los medios adecuados para

contender ante un estrés por falta de nutrientes o ATP y así mantenga su supervivencia evitando que la célula muera (Rodríguez *et al.*, 2013).

En un contexto multicelular la autofagia es necesaria para la supervivencia de los mamíferos, ya que experimentos realizados en ratones en condiciones de ayuno, mostraron que, si se eliminaba a Atg7, un gen esencial para el desarrollo de autofagia, los animales se morían al poco de nacer (Guo *et al.*, 2016), lo que sugirió que la actividad autofagica es necesaria para que el ratón recién nacido sobreviva durante los primeros momentos fuera de la madre. También, se observó que, si se les alimentaba, su supervivencia solo duraba por un corto período, demostrando que el proceso era esencial para la supervivencia, independientemente del ayuno (Guo *et al.*, 2016). Las reservas se agotan rápidamente en un catabolismo acelerado como el de un recién nacido y, al no poder mantener los niveles circulantes de glucosa, los animales mueren rápidamente por hipoglucemia, daño hepático y neurodegeneración (Guo *et al.*, 2016). Por lo tanto, la autofagia, además de una respuesta al estrés, es un proceso requerido normalmente para mantener la homeostasis en el metabolismo celular.

El primer estudio que relaciona el cáncer con la autofagia se realizó en el año 1999 cuando descubrieron que Beclina 1, la cual es una proteína esencial en la autofagia, era capaz de inhibir la tumorigénesis (Liang *et al.*, 1999). Posteriormente se descubrió que la autofagia es crucial en el control del desarrollo tumoral favoreciendo tanto el crecimiento como la eliminación de las células cancerígenas (Galluzzi *et al.*, 2008). El rol pro-tumoral es evidente cuando los tumores en crecimiento adquieren un tamaño razonable, dificultando que lleguen nutrientes y oxígeno al interior de la masa tumoral mientras no se desarrolle el proceso angiogénico. La autofagia en esta etapa constituye una estrategia de supervivencia hasta que se logra una buena irrigación sanguínea y la consiguiente provisión de nutrientes y oxígeno (Jin *et al.*, 2007).

## 2.2 Mecanismo molecular de la autofagia

El proceso de la autofagia en los organismos eucariotas ocurre en tres pasos básicos:

1. **Nucleación de las vesículas autofágicas.** La vesícula de doble membrana se origina a partir de un fragmento rodeado por la membrana de nucleación autofagosomal. Estudios han demostrado que, en levadura, algunas mutantes defectuosas en el tránsito del aparato de Golgi también tienen una participación en el proceso de autofagia, esto quiere decir que la vesícula autofágica deriva también del aparato de Golgi. Existe la autofagia no específica la cual es un proceso de iniciación que es completamente no selectivo, es decir, una porción cualquiera del citoplasma incluyendo los orgánulos son envueltos por el autofagosoma. Mientras que, en la autofagia selectiva, los orgánulos defectuosos son envueltos por el autofagosoma en el cual debe haber algún tipo de señal o sitio de unión en el orgánulo para dirigir la nucleación del autofagosoma (Arteaga y García, 2017).
2. **Crecimiento y formación de la vesícula autofágica.** Las membranas que darán forma y crecimiento al autofagosoma se derivan del acoplamiento por fusión de las vesículas u otras membranas de otros organelos, con la membrana del autofagosoma. Estudios en levaduras sometidas a estrés en donde se realizaron rastreos genéticos para identificar genes que participan en la formación del autofagosoma, encontraron que cerca de 30 genes participan en este proceso. Uno de estos genes codifica para la proteína Atg8, que está ligada al lípido fosfatidiletanolamina y, así, se une a la lamela citoplasmática de la vesícula autofágica. La asociación de la proteína Atg8 con una vesícula de la membrana donadora puede ser un paso clave en guiar a la vesícula para fusionarse con el autofagosoma en formación. Las vesículas que contienen Atg8

y su acoplamiento con el autofagosoma incluyen la unión citosólica a Atg12, Atg5 y Atg16 (Arteaga y García, 2017).

- 3. El direccionamiento de vesícula autofágica y su fusión.** Es posible que el autofagosoma ya formado contenga un conjunto de proteínas que dirigen su fusión al lisosoma. Posterior a la liberación de la proteína Atg8 ocurre la fusión del autofagosoma con el lisosoma, este paso ocurre únicamente cuando el autofagosoma está formado completamente con una doble capa. Así la proteína Atg8 parece enmascarar proteínas de fusión y evitar la fusión prematura del autofagosoma con el lisosoma (Arteaga y García, 2017).

Los estudios sobre la autofagia muestran que su inducción está controlada por las vías de señalización mTOR y AMPK. El papel de AMPK en la regulación de la autofagia tiene mucha relevancia ya que se considera que esta proteína es un punto de control central para mantener la homeostasis energética de la célula. La evidencia más reciente al respecto ha demostrado que la actividad de AMPK puede regularse mediante estímulos fisiológicos, independientemente de la demanda de energía de la célula, incluidas las hormonas y los nutrientes. La AMPK se activa mediante aumentos en ADP y AMP, las cuales muestran que el estado energético de la célula está comprometido. AMPK solo es activa cuando se fosforila en el residuo de treonina 172 (T172) en la subunidad catalítica ( $\alpha$ ) por quinasas como LKB1 y de la unión de ADP y AMP a la subunidad y lo cual causa cambios conformacionales que inhiben la desfosforilación de T172 y provocan una activación alostérica adicional (Hardie, 2007). La serina/treonina quinasa ULK1, como su homólogo de levadura Atg1, es un iniciador clave de la autofagia que está regulada negativamente por la mTOR quinasa, AMPK, un sensor de energía central, como un nuevo socio vinculante de ULK1. Se encontró que AMPK se une al dominio PS de ULK1 y esta interacción es necesaria para la autofagia mediada por ULK1 (Lee *et al.*, 2010).

Se ha confirmado que los homólogos únicos de Atg1 en *Dictyostelium discoideum*, *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster* son reguladores clave de la autofagia (Meléndez *et al.*, 2003). En los mamíferos se tienen al menos dos homólogos de Atg1 (Hara, T *et al.*, 2008), quinasa 1 similar a Unc-51 (ULK1) y ULK2, que comparten una alta homología con Atg1 de *C. elegans* (Tomoda *et al.*, 1999). De manera breve el complejo ATG1/ULK1 (compuesto por ULK1, FIP200, ATG13 y ATG101) y el complejo Clase III PI3K (compuesto por BECN1, ATG14, AMBRA1, VPS34, VPS15 y UVRAG) son necesarios para iniciar la nucleación del fagóforo. A continuación, son necesarias dos reacciones de conjugación para la formación del autofagosoma. En la primera, mediada por ATG7 y ATG10, ATG5 y ATG12 se conjugan y se unen a ATG16L. En el segundo, catalizado por ATG7 y ATG3 junto con el complejo ATG12-ATG5: ATG16L, ATG8/LC3 se promueve la fusión de la membrana, el alargamiento y el sellado del autofagosoma (Feng *et al.*, 2014). También se ha observado que la subfamilia LC3 como la GABARAP/GATE-16 son esenciales para la autofagia, ya que actúan en diferentes etapas de la formación del autofagosoma: los miembros de la subfamilia LC3 son responsables del alargamiento de la membrana autofágica, mientras que la subfamilia GABARAP/GATE-16 actúan corriente abajo en un paso acoplado a la disociación del complejo Atg12-Atg5-Atg16L (Weidberg *et al.*, 2010). Por otra parte, se ha observado que la conjugación con el lípido fosfatidiletanolamina (PE) genera que LC3-II se incorpore eficientemente a la membrana autofagosomal. El papel crucial de las proteínas Atg8 (LC3-II) en la biogénesis del autofagosoma está controlado por numerosos factores y modificaciones, como la acetilación y la fosforilación. La acetilación de las proteínas Atg5, Atg7, Atg8 y Atg12 está mediada por la acetiltransferasa p300 ya que regula negativamente su actividad (Lee *et al.*, 2009). Al igual que su ortólogo de levadura Atg8, las proteínas LC3 de mamíferos participan en la entrega de las cargas (proteínas cargo) a los autofagosomas. Aunque la vía autofágica en mamíferos se ha denominado un proceso no selectivo, parece que las proteínas Atg8 se dirigen selectivamente a los componentes citosólicos para la degradación lisosómica (Weidberg *et al.*, 2011).

Una vez formado el autofagosoma, éste se fusiona con el lisosoma, proceso que involucra varias proteínas lisosomales (Boya *et al.*, 2018), incluyendo LAMP y RAB7 las cuales son esenciales para completar con éxito la maduración del fagosoma, específicamente, para la transición de fagosomas tempranos a tardíos (Huynh *et al.*, 2007).

Por otro lado, a la par de todas las proteínas anteriormente mencionadas durante todo este proceso molecular de la formación del autofagosoma existe otro proceso que es el crecimiento de la membrana del autofagosoma. Para ello dependiendo de dónde se localice el autofagosoma y que tipo de autofagia es la que se esté llevando a cabo será el tipo de organelo que cederá su membrana al autofagosoma. Existe un estudio que muestra cómo es que a través de un marcador de las vesículas tipo COPII denominado Axl2 se pudo determinar que estas vesículas cambian su ruta de la vía anterógrada en condiciones normales de crecimiento a los autofagosomas durante un estrés activado por rapamicina. Esto mostró que estas vesículas también son fuente de membrana del autofagosoma (Shima *et al.*, 2019). De manera interesante también se observó que esta proteína Axl2 es una proteína cargo de Erv14 el cual es un receptor de proteínas cargo de una amplia variedad de proteínas de membrana y que tiene una función de selección y montaje de sus cargos dentro de las vesículas tipo COPII (Shima *et al.*, 2019).

### 2.3 Ruta secretoria

La ruta secretora dentro de la célula se integra de una serie de compartimentos membranosos especializados cuya estructura molecular característica posibilita el tránsito de moléculas entre estos compartimentos con la finalidad de que estas moléculas logren llegar a sus destinos finales. El adecuado desempeño de la célula sólo se puede lograr si estos orgánulos se comunican entre sí, de manera que sus diversas ocupaciones estén coordinadas. Esta comunicación se basa, básicamente, en el continuo tránsito de moléculas de unos compartimentos a otros. Esto involucra que los orgánulos sean altamente dinámicos, y necesiten, por consiguiente, de mecanismos para retener y reciclar sus moléculas propias (Pérez, 2016).

Las células eucariotas muestran un sistema de endomembranas que constituye la ruta secretora. Esa ruta es responsable del transporte de una gran proporción de proteínas y lípidos a sus destinos funcionales, y es importante tanto para el desempeño de la célula como para el desarrollo pluricelular (Lee *et al.*, 2004). Se considera que un tercio del proteoma de las células eucariotas pasa a través de la ruta secretora (Ghaemmaghami *et al.*, 2003).

Durante la ruta secretora, las moléculas viajan en vesículas lipídicas, que emergen a partir de un compartimento subcelular donador y se fusionan con un compartimento receptor o aceptor. Esta clase de transporte obtiene por esto el nombre de transporte vesicular (Bonifacino & Glick, 2004).

La vía secretora está conformada por organelos estructuralmente diversos, e intermediarios que permiten el paso de proteínas cargo facilitando de esta forma el transporte de estas proteínas entre los distintos organelos. Entre los compartimentos que integran la vía secretora se hallan: RE, los sitios de salida del RE (ERES - "ER exit sites"), el compartimento intermedio entre el RE y el AG (ERGIC - "ER-Golgi

intermediate compartment”) o conglomerado de vesículas y túbulos (VTCs - “vesicular tubular clusters”), el complejo de Golgi y la red del trans-Golgi. Los endosomas también se incluyen dentro de esta vía, ya que participan en el transporte de proteínas cargo en ciertos tipos celulares (Ang y Folsch, 2012).

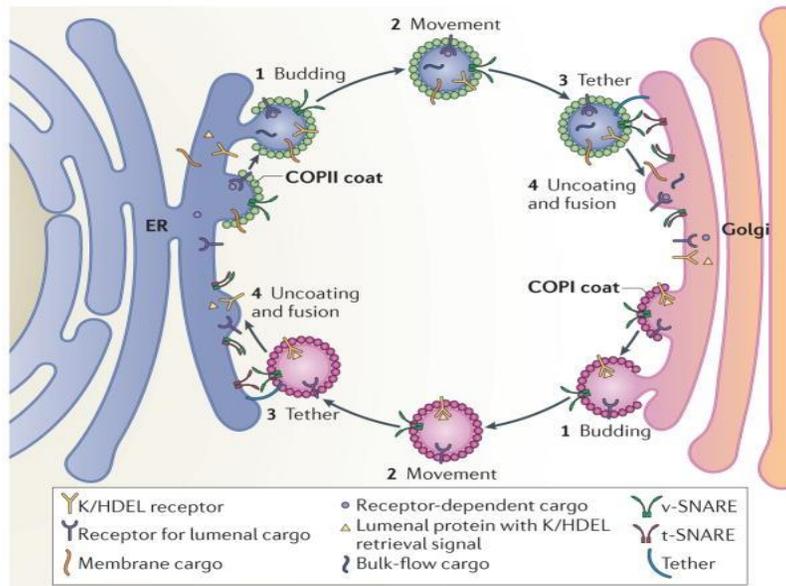
Esta comunicación es posible debido al complejo transporte que ocurre entre las membranas de cada compartimento (este proceso involucra múltiples funciones celulares, como la síntesis de proteínas, transporte de miles de moléculas a diferentes orgánulos o compartimentos, secreción, captación de moléculas extracelulares o transducción de señales). Por lo tanto, la homeostasis celular, la comunicación de célula a célula durante el desarrollo y las respuestas fisiológicas a los cambios ambientales dependen de este transporte (Park y Jurgens, 2012; Pfeffer, 2013).

También se conoce que este transporte de vesículas puede ocurrir en la dirección "hacia adelante" (transporte anterógrado), desde el RE hacia el AG, o en la dirección opuesta del AG hacia el RE (transporte retrógrado). El transporte general incluye desde la ruta secretora hasta el aparato de Golgi, el transporte dentro del Golgi y desde la red trans-Golgi (TGN) a la membrana plasmática, o a través de la ruta lateral al endosoma o vacuola a través del endosoma (Brandizzi y Barlowe, 2013).

Por definición, el transporte vesicular es una vía para el transporte de membranas y sus cargas, en el que un conjunto de compartimentos de membranas puede facilitar el movimiento de la carga en las direcciones anterógrada o retrograda (Figura 1; Brandizzi y Barlowe, 2013). Por lo tanto, la vía secretora establece un equilibrio entre el transporte anterógrado y retrógrado ya que depende de las necesidades de la célula. Si se produce un cierto tipo de disfunción en cualquier parte de este equilibrio, puede provocar cambios que intervengan en la homeostasis celular (Hanton *et al.*, 2005).

El transporte de proteínas solubles desde el RE a la superficie celular usa esta vía convencional: solo se debe cumplir una condición, la proteína debe tener el péptido

señal en el extremo N-terminal que le permita dejar el RE. Este proceso se observa para muchas enzimas solubles, así como para la proteína verde fluorescente GFP ("proteína verde fluorescente"; Park y Jurgens, 2012).



**Figura 1. El transporte bidireccional entre el ER y el Golgi está mediado por COPI y COPII**

El transporte bidireccional de las proteínas cargo entre el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi requiere de la gemación, el movimiento y la fusión del complejo de proteínas de la cubierta tipo II (COPII, ruta anterógrada) y de la cubierta tipo I (COPI, ruta retrograda) en sus respectivos compartimentos. El complejo COPII facilita la exportación de las proteínas cargo de manera selectiva y de su flujo hacia el aparato de Golgi. Y la función de COPI es facilitar la recirculación de proteínas específicas del retículo endoplásmico desde el aparato de Golgi (Brandizzi y Barlowe, 2013).

## 2.4 Complejo de proteínas de la cubierta tipo II: transporte mediado por vesículas de la vía anterógrada del RE al aparato de Golgi

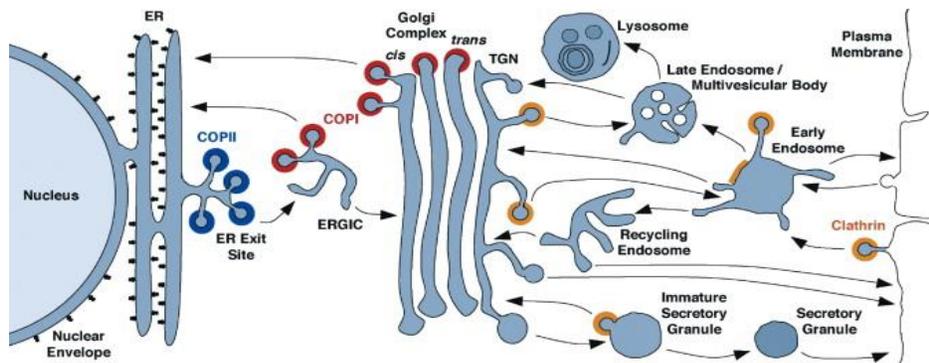
Una vez que las proteínas han sido sintetizadas en el RE rugoso son sujetas a incorporarse en la vía secretora. En este proceso participan una serie de vesículas que surgen de un compartimento, atraviesan el citoplasma y se fusionan con un organelo subcelular receptor. Las vesículas tipo COPII participan activamente en el transporte anterógrado de material celular desde el RE como parte de la vía secretora (figura 1). Los reportes muestran que en levaduras el complejo COPII requiere seis proteínas (Sar1, Sec12, Sec23, Sec24, Sec13 y Sec31) para llevar a cabo su función (Barlowe y Miller, 2013).

La formación de la vesícula COPII inicia por la movilización y activación de la pequeña proteína G llamada Sar1 (Nakano y Muramatsu, 1989; Barlowe *et al.*, 1993) y su posterior activación a través del intercambio de GDP por GTP. Esta activación la realiza una proteína de membrana del RE denominado intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) Sec12 (Nakano *et al.*, 1988; d'Enfert *et al.*, 1991). La proteína Sar1 unida a GTP se une a la membrana y recluta posteriormente al complejo heterodimérico de Sec23/Sec24 (Matsuoka *et al.*, 1998). Sec23 es la proteína activadora de GTPasa (GAP) para Sar1 (Yoshihisa *et al.*, 1993). Se conoce también que Sec24 puede unirse a las proteínas cargo, y además posee varios dominios que interactúan directamente con varias proteínas de carga (Miller *et al.*, 2002, 2003; Mossessova, 2003). Sar1 / Sec23 / Sec24 a su vez reclutan al complejo heterotetramérico de Sec13 y Sec31 (Matsuoka *et al.*, 1998b). Sec31 también contribuye a la actividad de GTPasa y contribuye al revestimiento estimulando la actividad de GAP (Antonny *et al.*, 2001; Bi *et al.*, 2007). Por lo tanto, la capa completamente ensamblada se compone de dos capas distintas: la capa proximal de la membrana "interna" de Sar1 / Sec23 / Sec24 que se asocia íntimamente con los grupos de lípidos (Matsuoka *et al.*, 2001) y la capa externa de Sec13-Sec31.

Un dato interesante que se obtuvo de una mezcla de las proteínas Sec23p • Sec24p, Sec13p • Sec31p purificadas y Sar1p en su forma activa unido a GTP es suficiente para generar vesículas liposomales recubiertas por estas proteínas, sugiriendo que estas proteínas son intrínsecamente capaces de deformar la membrana y dar inicio al nacimiento de una vesícula en el retículo endoplásmico (Matsuoka *et al.*, 1998).

Además de las proteínas anteriormente descritas también están los receptores de proteínas cargo, que sirven como receptores que seleccionan a proteínas que serán transportadas en vesículas específicas (Bonifacino, 2014).

Los procesos de gemación y fusión se repiten en los pasos de transporte consecutivos hasta que la carga llega a su destino final dentro o fuera de la célula. Para equilibrar este movimiento hacia adelante de la carga, la homeostasis de los orgánulos requiere la recuperación de los componentes de la maquinaria de transporte y las proteínas residentes escapadas de los compartimentos aceptores a los compartimentos donantes correspondientes por lo que el transporte retrógrado es importante (Figura 2; Bonifacino & Glick, 2004).



**Figura 2. Bidireccionalidad de la ruta secretora.**

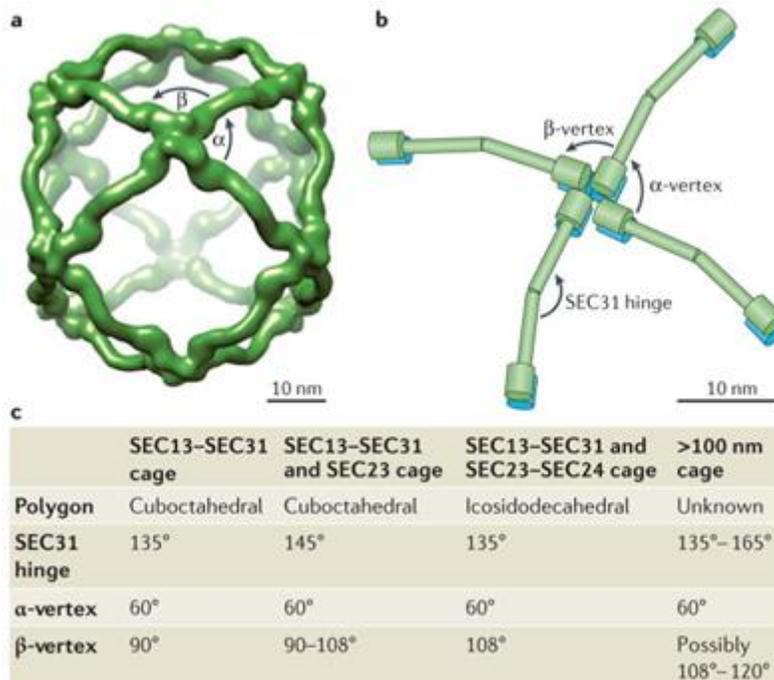
Todos los orgánulos celulares están conectados mediante transporte de vesículas. En azul se muestran proteínas de cubierta COPII que median el transporte desde el retículo endoplásmico (RE) al compartimento intermedio (ERGIC). En rojo, las cubiertas COPI, responsables del transporte retrógrado intra-Golgi y Golgi-retículo. En amarillo, las vesículas con cubiertas de clatrina, responsables del transporte post-Golgi (Bonifacino & Glick, 2004).

La existencia de vesículas COPII en plantas aún está en debate. Sin embargo, en *Arabidopsis*, casi todos los componentes de la cubierta COPII tienen proteínas heterólogas, que incluyen 3 subtipos de la GTPasa Sar1 (Hanton *et al.*, 2005) y otras subunidades (Sec23 con 7 parálogos, Sec24 con 3, Sec31 con 2 y 2 parálogos para Sec13; Brandizzi y Barlowe, 2013). Aunque hay algunos ejemplos de la posible identificación de las vesículas COPII en plantas (Robinson *et al.*, 2007; Langhans *et al.*, 2012; Donohoe *et al.*, 2013), es difícil encontrar estructuras similares a las vesículas COPII mediante microscopía electrónica. La dificultad para observar vesículas COPII en plantas puede deberse a su rápida formación y cinética de consumo en la interfaz ER-Golgi.

La dinámica de trabajo de las diferentes proteínas que integran a las vesículas COPII muestra que en el caso particular de Sec24 cuenta con diferentes dominios de interacción con proteínas carga transmembrana. La señal consenso propuesta para la unión de Sec24 a COPII estaría formada por motivos di-aromáticos como la difenilalanina (Figura 3; Malkus *et al.*, 2002). Las diferentes isoformas de Sec24 (Sec24A, B, C y D en mamíferos, y Lst1p/Sfb3p y Lss1p/Sfb2p en levaduras) aumenta aún más la posible lista de cargos distintos que la cubierta es capaz de incorporar a las vesículas. Se cree que cada isoforma de Sec24 ayudaría a superar las dificultades topológicas y estéricas que cada tipo específico de proteína carga presenta para incorporarse eficientemente en una determinada vesícula COPII (D'Arcangelo *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2003).

Uno de los mecanismos para mantener la asimetría composicional entre RE y Golgi es el transporte retrógrado al RE de proteínas que deben recircular hacia el RE. En otras palabras, para que el sistema funcione, además de existir un tráfico anterógrado que transporta el cargo, existe un transporte retrógrado de vuelta al RE para todas aquellas proteínas que se escapan o que intervienen en el transporte dependiente de COPII. Dicho transporte retrógrado es esencial para el funcionamiento de la ruta secretora (Spang *et al.*, 2001). El tráfico retrógrado Golgi-RE está mediado por el complejo de

cubierta COPI. El complejo COPI, también denominado coatómero, está formado por siete subunidades ( $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$ ,  $\alpha$ ,  $\beta'$ ,  $\epsilon$ ). Se localiza principalmente en el aparato de Golgi, en el compartimento intermedio RE-Golgi que existe en mamíferos (ERGIC, *endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment*, un complejo túbulo-vesicular entre el RE y el Golgi, que se puede ver como una cisterna del Golgi con gran actividad de transporte retrógrado y en vesículas de transporte (Duden *et al.*, 1991).



**Figura 3. La estructura de COPII facilita el transporte de carga diversa.**

Los análisis estructurales han demostrado la estructura del complejo de proteínas de la cubierta II (COPII), consta de los subcomplejos SEC13-SEC31 y SEC23-SEC24, tiene una arquitectura flexible. (a) Modelo de reconstrucción con microscopio electrónico de la jaula cuboctaédrica SEC13-SEC31 que se forma con SEC13-SEC31 de mamífero purificado. (Stagg S. *et al.*, 2006) (b) Representación esquemática de los heterotetrámeros SEC31-SEC13 (mostrados en verde y azul) dispuestos en un punto de vértice, lo que indica ángulos variables en la geometría observada de las jaulas COPII. (c) Las estructuras para la unidad de ensamblaje SEC13 – SEC31 y la caja SEC13 – SEC31 en presencia de SEC23 (Bhattacharya N. *et al.*, 2012) y SEC23 – SEC24 (Stagg S. *et al.*, 2008) Las variaciones en la bisagra SEC31 (135° – 165°) así como en el ángulo del vértice  $\beta$  (90° – 108°) de la jaula SEC13 – SEC31 se han documentado y se enumeran en la tabla. El ángulo del vértice  $\alpha$  es constante a 60° en cada una de las condiciones. En las condiciones en las que SEC23-SEC24 se agrega a SEC13-SEC31, se observaron geometrías de jaula cuboctaédrica (un polígono de 24 bordes) e icosidodecahedral (un polígono de 60 bordes) con cada

borde compuesto por un heterotetrámero SEC13-SEC31. A medida que el ángulo  $\beta$  se acerca a  $120^\circ$  en el caso de vesículas o túbulos muy grandes, la caja de COPII puede producir retículas casi planas (Stagg S. *et al.*, 2008).

Después de que una vesícula pierde su cobertura externa, debe dirigirse al compartimento aceptor apropiado. El paso final en la existencia de una vesícula es la fusión con la membrana aceptor. Sorprendentemente, las reacciones de focalización y fusión dependen de la misma clase de proteínas, que se identificaron en un *tour de force bioquímico* (Bonifacino & Glick, 2004).

Una vez alcanzado el compartimento aceptor, las vesículas experimentan un proceso gradual de reconocimiento y anclaje (tethering), necesario para la posterior fusión a la membrana del orgánulo. La maquinaria responsable de este proceso está formada por un grupo de proteínas citosólicas que se asocian a las membranas de los orgánulos (factores de anclaje) y una GTPasa pequeña de la familia Rab, que varían según el paso de transporte. Tras la evaginación de los ERES, las vesículas COPII se anclan y fusionan con la membrana del Golgi liberando allí su carga y completando, de esta forma, la primera etapa de transporte anterógrado de la ruta secretora.

Se han descrito modificaciones post-traduccionales de las proteínas pertenecientes a la cubierta COPII que podrían regular su función, como la ubiquitinación y la fosforilación. Por un lado, Sec23 es diana de ubiquitinación y parece ser rescatada de la degradación gracias a Bre5/Ubp3 (Cohen *et al.*, 2003). Por consiguiente, una proteína tipo SNAREs, Sly1p/SCDF1, miembro de la familia de proteínas SM (Sec1/Munc18-1), es necesaria para la fusión de las vesículas COPII al Golgi. Sly1p/SCDF1 se une directamente a Sed5p/Syntaxina-5, aumentando la fidelidad del ensamblaje de las cuatro SNAREs y estabilizando el complejo trans-SNARE (Ferguson *et al.*, 2009; Peng & Gallwitz, 2002). La mayoría de las SNARE son proteínas transmembranales ancladas en el extremo C-terminal, con sus dominios funcionales al extremo N-terminal dando hacia el citosol. Cada una de estas proteínas contiene un "motivo SNARE" repetido en heptada de 60 a 70 aminoácidos que pueden participar en la formación de espirales (Bock y col., 2001).

Las SNARE parecen realizar dos funciones principales. Una función es promover la fusión en sí. En todas las reacciones de transporte que se han examinado, la formación de complejos trans-SNARE es esencial para la fusión. Se cree que el ensamblaje del paquete de cuatro hélices suministra la energía libre necesaria para acercar las membranas opuestas lo suficiente para fusionarse (Hanson y col. 1997; Weber y col. 1998; Chen y Scheller 2001). Una vez que se ha completado la fusión, Bet1p, Sed5p, Sec22p y Bos1p se encuentran en la misma membrana formando un complejo estable en *cis*. Con el fin de reciclar estas SNAREs para futuras rondas de transporte, es necesaria la intervención de la proteína Sec18p/NSF junto con Sec17p/SNAP, que desensamblan el complejo SNARE (Bonifacino & Glick, 2004).

## **2.5 Receptores de proteína cargo**

Las proteínas localizadas en ciertas zonas de las membranas permiten la comunicación específica entre los distintos compartimentos intra y extracelulares (Engel y Gaub, 2008). Los receptores cargo son principalmente proteínas, aun cuando en ocasiones tienen la posibilidad de ser lipoproteínas. En algunas ocasiones el receptor es el efector de la respuesta, la mayor parte de las veces la relación del ligando con su receptor conduce a la activación de moléculas efectoras del medio intracelular causantes de empezar la respuesta (Aguilera-Romero *et al.*, 2008).

Los receptores cargo son principalmente proteínas, aun cuando en ocasiones tienen la posibilidad de ser lipoproteínas. En algunas ocasiones el receptor es el efector de la respuesta, la mayor parte de las veces la relación del ligando con su receptor conduce a la activación de moléculas efectoras del medio intracelular causantes de empezar la respuesta (Aguilera-Romero *et al.*, 2008).

Dentro del tráfico vesicular el papel de las proteínas carga transmembranales que son los blancos de los receptores cargo ayudan a estabilizar a las proteínas de la cubierta

vesicular (Aguilera-Romero *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2004). De igual modo, este modelo involucra que la cubierta proteica no se libera tras la formación de la vesícula, como clásicamente se había considerado, sino que quedaría unida a la membrana gracias a su relación con las moléculas carga. Además, esta alianza es elemental debido al papel de las cubiertas en las próximas fases del transporte vesicular (Cai *et al.*, 2007a; Lord *et al.*, 2011).

Las proteínas que están ancladas a la membrana celular pueden contribuir al transporte o funcionar como receptores de proteínas carga entre otras funciones (Roman-Fernandez *et al.*, 2016). Para que cada una de estas proteínas pueda incorporarse eficientemente en las vesículas COPII se requiere de la acción de una proteína transmembrana que actúa como adaptadora conectándolas con las proteínas Sec23-Sec24 que integran la cubierta. Estas proteínas adaptadoras se llaman genéricamente receptores de carga o de transporte (Dancourt & Barlowe, 2010). Hasta la fecha se han reconocido diversos receptores de transporte, aun cuando cabría esperar que la lista aumente progresivamente. Todos ellos poseen en común que son proteínas bastante abundantes, con señales tanto de exportación del RE como de reciclaje, las cuales les permiten ciclar siempre entre el RE y el Golgi. Además, estos receptores cargo son específicos y selectivos a sus cargas y no a otras proteínas de secreción. Otra característica fundamental es que permanecen bastante conservados en la escala evolutiva, aun cuando en ciertos organismos no se hayan reconocido aún sus ligandos o cargas. Finalmente, es fundamental resaltar que todos los receptores que se han caracterizado son oligómeros, con lo cual incrementa considerablemente su eficiencia de transporte (Dancourt & Barlowe, 2010).

Los receptores cargo pueden seleccionar cargas específicas que pueden ser proteínas solubles o de membrana destinadas a diferentes orgánulos o membranas vesiculares (Dancourt y Barlowe, 2010). Es realmente importante que para que las proteínas carga dejen sus organelos estos receptores las seleccionen y las empaqueten en las correctas vesículas. En levaduras se tiene documentado la actividad de 49 receptores

cargo tales como Erv14, Erv15, Erv26, Erv29, Emp24, Emp47, Gdf2, Chs7 y Shr3-DAmP entre otros (Herzig *et al.*, 2012).

Los receptores de carga son por consiguiente proteínas transmembrana con 2 dominios evidentemente diferenciados: un dominio citosólico con las señales primordiales para unirse a las cubiertas COPII y COPI, lo cual posibilita que ciclen entre el RE y el Golgi, y un dominio luminal y/o transmembrana que reconoce las proteínas maduras o correctamente plegadas y/o ensambladas de sus cargas. De esta manera, se consigue acoplar la selección de la proteína carga con el ensamblaje de la cubierta y la siguiente formación de la vesícula COPII (Dancourt & Barlowe, 2010; Manzano-Lopez *et al.*, 2015).

Actualmente se han identificado varios receptores de transporte, aunque cabría esperar que la lista aumente progresivamente. Los receptores de carga mejor caracterizados en la ruta secretora temprana, ERGIC-53, Erv14, Erv29/Surf4, las proteínas p24 y Erv26 son receptores de transporte anterógrado, mientras que Rer1, el receptor KDEL y Erv41-Erv46 son receptores de transporte retrógrado. En sus dominios citosólicos presentan señales para unir las cubiertas COPII y las cubiertas COPI (Dancourt & Barlowe, 2010). En levaduras, los receptores identificados son las proteínas p24, la proteína Emp47p, así como varias proteínas Erv (ER vesicle protein): Erv29p, Erv14p, Erv26p y Erv41p-Erv46p. La proteína Emp47p (EndoMembrane Protein) posee un dominio lectina, por lo que ha sido propuesta como receptor de carga del RE para glicoproteínas. Inicialmente, se describió que es necesaria para el transporte al Golgi de la proteína Emp46p (Sato & Nakano, 2003). La proteína Erv29p es requerida para la incorporación eficiente en vesículas COPII de algunas proteínas solubles como el pro-factor alfa, la carboxipeptidasa Y (CPY) y la proteinasa A (Belden & Barlowe, 2001; Caldwell *et al.*, 2001). Erv26p es el receptor de carga para las proteínas transmembrana de tipo II, como la fosfatasa alcalina y las manosil-transferasas del Golgi (Bue *et al.*, 2006; Inadome *et al.*, 2005; Noda & Yoda., 2010). Erv41p-Erv46p actúa como receptor

de transporte anterógrado para la manosil-transferasa de Golgi Ktr4p (proteína transmembrana tipo II) reconociendo su dominio luminal (Noda *et al.*, 2014).

## 2.6 Receptor de proteína cargo: Erv14

Los receptores cargo de la familia Cornichon o Erv14 en levaduras, son proteínas con tres dominios transmembranales a las cuales se les ha conferido un papel importante en la exportación eficiente de numerosas proteínas en la ruta anterógrada de distintos organismos (Pagant *et al.*, 2015). La familia conservada Erv14/cornichon (Erv14 en levadura y cornichon en metazoarios y plantas) es necesaria para la exportación eficiente del retículo endoplásmico de numerosas proteínas de membrana (Powers J, Barlowe C, 1998; Rosas-Santiago *et al.*, 2016).

Cornichon (CNIH) es una proteína conservada que se encuentra en eucariotas, inicialmente identificada en *Drosophila melanogaster* (Belden y Barlowe, 2001). También se ha identificado en mamíferos donde se descubrió que estaba asociado con receptores de glutamato del subtipo AMPA (Schwenk *et al.*, 2009).

Varios estudios demuestran que la mutación de Erv14 en levaduras genera un fenotipo muy similar al de la cepa tipo silvestre, sin embargo, se observó que presenta una localización de la proteína Axl2p en el RE. Axl2 es una proteína que tiene un papel fundamental en el establecimiento del crecimiento polarizado y del brote axial de la levadura (Powers y Barlowe, 1998, 2002) por lo que la correcta función de Erv14 es fundamental para este proceso. En la cepa mutante en *erv14Δ*, Axl2p se acumula en el RE, mientras que otras proteínas secretoras se transportan de manera similar a la cepa tipo silvestre. Basado en dichos hallazgos, propusieron que Erv14 ciclaba entre los compartimentos RE y Golgi y que desempeñaba un papel en la exportación de proteínas carga desde el RE (Powers y Barlowe, 1998).

Las proteínas de membrana que tienen el potencial de interactuar directamente con la capa COPII no requieren de un receptor de carga. Sin embargo, algunas proteínas cargas interactúan con algún receptor específico por lo que Erv14 logra esta interacción con las proteínas carga y con las proteínas del complejo COPII permitiendo que las proteínas carga se empaqueten en estas vesículas (Sharpe *et al.*, 2010; Pagant *et al.*, 2015).

Se ha observado que algunas de sus cargas se unen a dos sitios en Sec24 de forma simultánea: indirectamente a través de Erv14, y directamente gracias a sus propias señales, de esta forma, se incrementaría la eficiencia de unión a la cubierta, y por tanto la eficiencia de salida del RE (Pagant *et al.*, 2015).

Cornichon también se ha identificado en la planta del arroz (*Oryza sativa*) y en *Arabidopsis thaliana* (Rosas-Santiago *et al.*, 2015; Wudick *et al.*, 2018). Los estudios en el arroz demostraron que cornichon es necesario para que un transportador altamente selectivo a iones de sodio se pueda establecer de manera correcta en la membrana del aparato de Golgi donde pudiera tener una función como corriente de corto circuito. Además, en este mismo estudio se demostró que cornichon de *Arabidopsis* interactúa con 535 proteínas, las cuales van desde canales iónicos hasta enzimas (Rosas-Santiago *et al.*, 2015). Un trabajo reciente ha demostrado que los mutantes en levaduras de Erv14 también muestran la acumulación en el RE de las proteínas Sma2 (Nakanishi *et al.*, 2007), Mid2, Gap1, Hxt1 y Hxt2 (Castillon *et al.*, 2009). Debido al gran número de proteínas con las que interactúa cornichon es probable que también esté interactuando con proteínas que estén relacionadas a la autofagia y así tener una participación dentro de este proceso celular.

## 2.7 Modelo de estudio: *Saccharomyces cerevisiae*

*Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos modelo eucariótico más usado. Se ha utilizado como modelo para estudiar el envejecimiento (Murakami et al., 2009), la regulación de la expresión génica (Biddick, 2009), la transducción de señales (Hohmann, 2007), el ciclo celular (Nasheuer et al., 2002), el metabolismo (Brocard-Masson et al., 2006; López-Mirabal et al., 2008), la apoptosis (Owsianowsk et al., 2008), los trastornos neurodegenerativos (Miller-Fleming et al., 2008), y muchos otros procesos biológicos.

Una ventaja de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es su organización intracelular compleja y similar a la de otras células eucariotas, las contribuciones fundamentales al estudio de procesos celulares como la señalización celular, el tráfico de membranas, el metabolismo de los lípidos y la importación de mitocondrias, entre otros. Otra ventaja es la facilidad de manejo en comparación con otros tipos de eucariotas superiores, así como un tiempo de generación corto de aproximadamente 1.5 h en medio rico. Además, estas células pueden almacenarse fácilmente a corto o largo plazo en placas a 4°C o en glicerol a -80°C respectivamente (Feyder et al., 2014).

En las células eucariotas, las proteínas solubles y de membrana generalmente se sintetizan en el RE y, por lo tanto, deben transportarse a su compartimento diana correcto para cumplir su función, sufrir modificaciones o degradarse. Después de ser sintetizadas en el RE, las proteínas se dirigen al aparato de Golgi donde se clasifican entre las transportadas a la membrana plasmática y las dirigidas a la vacuola a través de endosomas (clasificación de proteínas vacuolares o vía VPS). Las proteínas de la membrana plasmática pueden internalizarse por endocitosis y transportarse a los endosomas, donde se clasifican entre las que se dirigen a la degradación vacuolar y las que se redirigen al Golgi (entran en la vía secretora para volver a dirigirse a la membrana plasmática). Una de las vías de interés de este proyecto es precisamente la ruta secretoria desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi que ha sido

identificada por estudios hechos en *S. cerevisiae*, y que se conserva en las eucariotas (Bard *et al.*, 2006; Conibear *et al.*, 2010; Dancourt *et al.*, 2010; Muniz *et al.*, 2014).

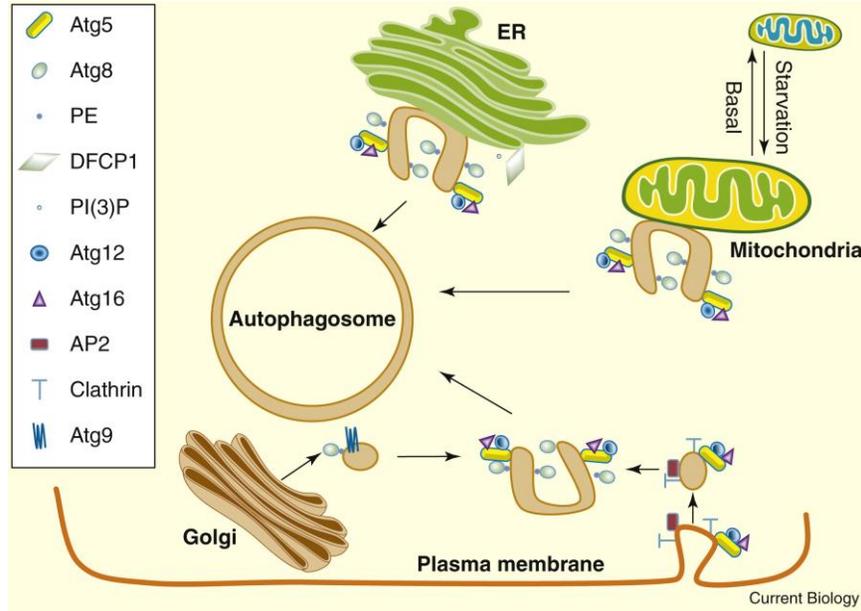
En el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* el tráfico vesicular ha sido caracterizado y se ha logrado identificar que las vesículas COPII que transportan proteínas carga solubles y de membrana dependen de diferentes receptores carga de clasificación localizados en el RE (Dancourt *et al.*, 2010). Muchas proteínas transmembranales dirigidas a la ruta secretora se reclutan en las vesículas COPII gracias a Erv14, mientras que la exportación desde el RE de proteínas de membrana tipo II (N- terminal en el citoplasma) depende del receptor de membrana Erv26. Las proteínas ancladas con glicosilfosfatidilinositol (GPI) se separan de las proteínas de la membrana plasmática y se incorporan en diferentes vesículas recubiertas de COPII a través de la proteína Emp24 que es parte de la familia p24 (p24 $\beta$ ) que interactúa con Erv25 (Muniz *et al.*, 2001; Belden *et al.*, 2001; Castillon *et al.*, 2009). Esto muestra que la clasificación de la carga se realiza a nivel del RE (Muniz *et al.*, 2001). La proteína de membrana tetra-transversal Erv29 actúa como un receptor de carga para la clasificación de diferentes proteínas luminales solubles dentro del RE. La mayoría de estos mecanismos de clasificación de carga se conservan en células de mamíferos (Dancourt *et al.*, 2010).

La levadura *S. cerevisiae* ha aportado mucho en la identificación de complejos proteicos necesarios para el transporte de proteínas de un orgánulo a otro, es por ello que la levadura es fundamental para comprender un nuevo tipo de tráfico entre orgánulos mediante sitios de contacto directo membrana-membrana (Klecker *et al.*, 2014). Dado que su tráfico vesicular está bien caracterizado, la levadura es un organismo muy adecuado para estudiar enfermedades humanas cuya causa ha sido la mutación en genes que codifican proteínas de tráfico vesicular (Amoasi *et al.*, 2012).

## **2.8 La membrana del autofagosoma requiere de varios organelos incluyendo las vesículas COPII**

Ha sido difícil diferenciar entre las membranas que contribuyen a la nucleación del fagóforo y las que contribuyen a la expansión del fagóforo, pero la reciente elucidación de la jerarquía dependiente del tiempo y de la función entre las proteínas centrales de autofagia involucradas en la nucleación del fagoforo ha proporcionado marcadores para los diferentes pasos de la formación del fagóforo (Karanasios *et al.*, 2013; Koyama-Honda *et al.*, 2013). Las membranas autofagosómicas parecen ser ricas en lípidos insaturados (Reunanen *et al.*, 1985), y un estudio reciente indicó que la naturaleza de las cadenas de hidrocarburos de los lípidos de membrana influye en la autofagia (Ogasawara *et al.*, 2014). Otro estudio mostró que los autofagosomas inducidos por la inanición podrían emerger de sitios en las mitocondrias, con la ayuda de microscopía en células vivas se rastreó a marcadores para LC3 y Atg5 (Hailey *et al.*, 2010). Datos recientes sugieren que la membrana plasmática contribuye a las estructuras precursoras autofagosómicas tempranas, gran superficie de la membrana plasmática puede servir como un extenso depósito de membrana que permite que las células experimentan períodos de síntesis de autofagosomas a velocidades mucho más altas que en condiciones basales, sin comprometer otros procesos (Figura 4; Ravikumar *et al.*, 2010).

Las vesículas COPII proporcionan material para la formación de la membrana autofagosomal. La observación de la transferencia de lípidos o proteínas transmembrana constituye una evidencia directa de la contribución de un orgánulo como fuente de membrana para la biogénesis de otro orgánulo (Shima *et al.*, 2019).



**Figura 4. Fuentes de membrana para fagóforos.**

Los fagóforos requieren lípidos y proteínas para madurar y convertirse en autofagosomas. El retículo endoplásmico es el sitio de formación de omegasomas, que son esenciales para la formación y elongación del fagóforo. Las mitocondrias crecen tras la inanición y suministran vesículas lipídicas al fagóforo y el aparato de Golgi es esencial para el tráfico de vesículas que contienen Atg9 al fagóforo. La membrana plasmática aporta membranas a los fagóforos y autofagosomas tanto en condiciones basales como de inanición. (Rubinsztein *et al.*, 2012).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El descubrimiento de los genes que participan en la autofagia y la elucidación de sus mecanismos moleculares ha dado lugar a un nuevo paradigma en la comprensión de cómo la célula recicla su contenido. El presente trabajo se centra en determinar el cambio de localización del receptor cargo Erv14 desde las vesículas COPII a la vacuola, posiblemente a través de los autofagosomas. El estudio de proteínas como Erv14 es importante debido a que la función de Erv14 como receptor cargo de un gran número de proteínas cargo podría revelar su importancia en el proceso de autofagia quizás debido a la interacción con algunas proteínas que contribuyen en la formación del autofagosoma. Los alcances de esta investigación podrían tener implicaciones importantes para la salud humana debido a la participación de la autofagia en varias enfermedades.

### **4. HIPÓTESIS**

En las células de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la falta de nutrientes como la glucosa o el nitrógeno cambia la localización de Erv14 de las vesículas COPII a la vacuola, probablemente a través del autofagosoma.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar si durante la falta de nutrientes como la glucosa o el nitrógeno la localización de Erv14 cambia de las vesículas COPII a la vacuola.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar si la localización de Erv14 cambia debido a la falta de nutrientes en las células de levadura.
2. Transformar la levadura *BY4741erv14Δ (MATa his3Δleu2Δmet15Δura3Δ)* con la construcción del gen ERV14 a la proteína verde fluorescente (GFP)
3. Observar por microscopia confocal en diferentes condiciones de estrés la localización de la proteína Erv14-GFP

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

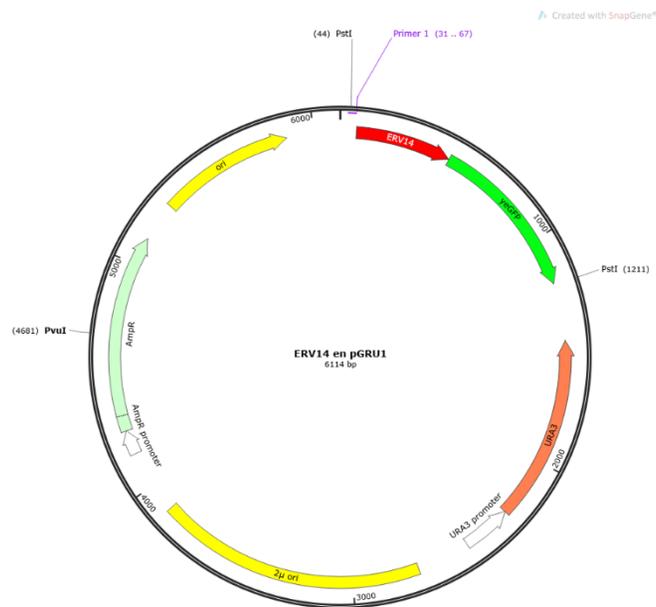
### 6.1 Transformaciones rápidas de levadura con Acetato de Litio

En este estudio la cepa de la levadura *S. cerevisiae* que se utilizó fue BY4741 $erv14\Delta$  (*MATa his3 $\Delta$ leu2 $\Delta$ met15 $\Delta$ ura3 $\Delta$* ) y la construcción usada fue la fusión del gen ERV14 a la proteína verde fluorescente (GFP) en su C-terminal clonada dentro del vector pGRU1. Esta construcción se nombró como pErv14-GFP (Figura 5). Para transformar a las células de la levadura con la construcción pErv14-GFP se prepararon 50ml de medio YPD sólido (Extracto de levadura 10 g, Peptona 20 g, Glucosa 20 g, Agar 24 g por litro de solución) se esterilizó en autoclave y se colocó en cajas Petri con 25ml de medio YPD cada una. Se plaqueó a la cepa BY4741 $erv14\Delta$  en las cajas Petri y se deja crecer por tres días a 28°C. También se prepararon 100 ml de medio YPD líquido y 150ml de YNB sólido (YNB sin aminoácidos 0.67% y glucosa 2%). La transformación de levadura se inició con un pre-cultivo de 5 ml de YPD inoculado con la cepa BY4741 $erv14\Delta$  en un matraz de 250 ml incubado por 12 h a 28°C. Posteriormente se agregaron 45 ml de medio líquido YPD y se esperó un tiempo estimado de 4 horas para que el cultivo alcanzara aproximadamente de 2 a 3 veces el duplicado de la densidad celular. Pasado el tiempo de incubación se precipitó los 50 ml de células en un tubo falcón de 50 ml por centrifugación durante 7 min a 4,500 rpm a temperatura ambiente. Durante la centrifugación, se desnaturalizó ADNss durante 10 min a 96°C y se refrigeró 5 min en hielo. Una vez terminado el tiempo de centrifugación se desechó todo el sobrenadante de las células precipitadas y resuspendieron en 45 ml de agua y 5 ml de 10xLiAc-TE (100 mM LiAc disuelto en Tris-EDTA 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7.5), se mezcló invirtiendo el tubo y posteriormente se centrifugaron las células durante 7 minutos a 4,500 rpm. Se desechó el sobrenadante y solo se usó el líquido restante en el tubo para resuspender al sedimento celular. Posteriormente se agregó 700 $\mu$ l de PEG 4000 al 50% (w/v), 80 $\mu$ l de 10xLiAc-TE a un tubo de 1,5 ml y se mezcló con una pipeta de 1 ml (todo se hizo a temperatura ambiente, excepto el ADNss que se mantuvo en

hielo hasta que se agregó). Finalmente se agregaron 180  $\mu$ l de células y 30  $\mu$ l de ADNss desnaturalizado y se mezcló inmediatamente con la pipeta de 1 ml.

Se agregaron 98  $\mu$ L de esta mezcla al tubo de PCR que contenía 1  $\mu$ l de ADN plasmídico (pERV14-GFP) a una concentración de 150 ng/ $\mu$ l. Se mezclaron las células con el plásmido a través de pipeteo y se incubó en el termociclador con las siguientes condiciones:

- 28°C 5 min
- 28°C 30min
- 42°C 13min
- 28°C continuamente



**Figura 5. Mapa del plásmido Erv14-GFP (pERV14-GFP).**

Una vez terminado el ciclo en el termociclador, se centrifugó el contenido de los tubos para concentrar las células en el fondo y así desechar el sobrenadante con una punta de 200 $\mu$ L y se agregaron 100 $\mu$ L de agua, para resuspender a las células. Para plaquear

en los medios de selección YNB con histidina, metionina y leucina (20 µg/ml), se usaron 70uL del contenido de los tubos de PCR y 30uL de agua y se colocaron perlas de vidrio para distribuir el contenido. Posteriormente se incubaron 3 días a 28°C. Se aislaron cuatro unidades formadoras de colonias en una caja Petri con medio YNB.

## **6.2 Microscopía de fluorescencia confocal**

La microscopía confocal se realizó utilizando un microscopio confocal multifotónico invertido Olympus FV1000 equipado con un objetivo de inmersión en aceite 60x (Olympus). La GFP se visualizó por excitación con un láser de argón multilínea a 488 nm y el detector espectral se ajustó entre 515/30 nm para la emisión. Las células se crecieron en medios YNB. Este medio se inoculó con la cepa de levadura BY4741*erv14Δ* transformada con pERV14-GFP y se dejó 12 h en incubación a 30°C para su crecimiento. Al otro día en los medios YNB, YNB-N (Yeast Nitrogen Base w/o aminoacids and ammonium sulphate 0.33% y glucosa 2%), YNB-G (sin glucosa) y YNB-N-G (sin nitrógeno y sin glucosa) se inocularon con el cultivo de 12 h y se dejaron crecer por 5 h para su posterior monitoreo cada hora durante 5 horas con el microscopio confocal.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 La localización de Erv14 cambia debido a la falta de nutrientes

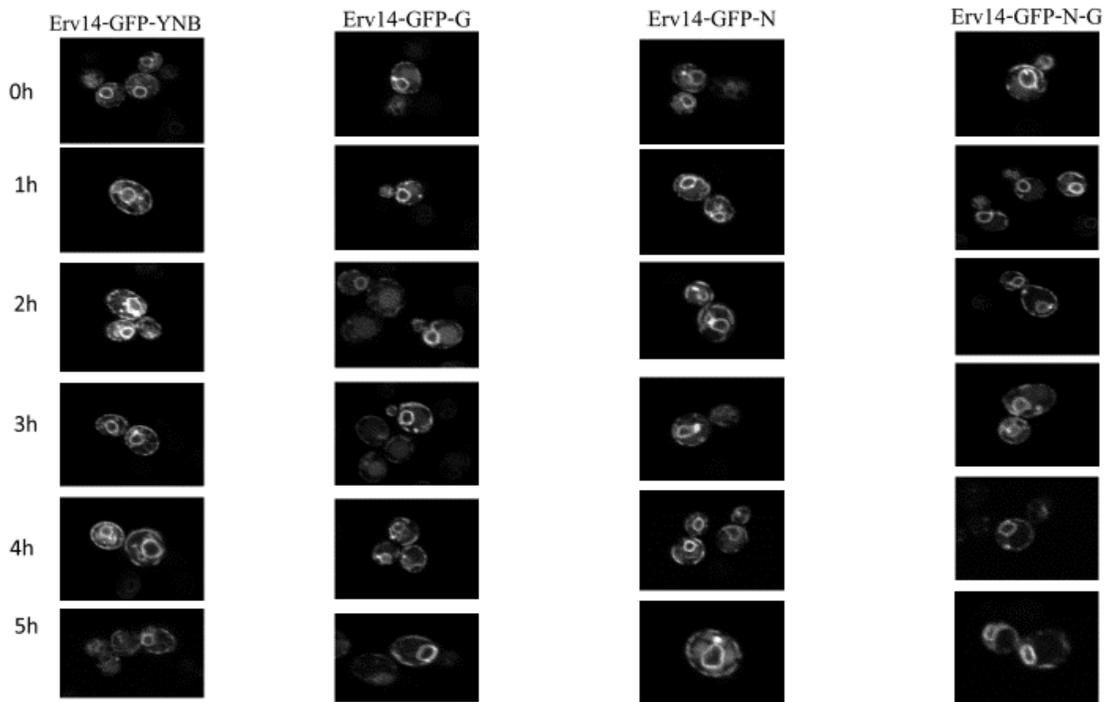
Para determinar si Erv14 cambia de localización debido a la falta de nutrientes debido a que las membranas de las vesículas COPII contribuyen a la formación del autofagosoma (Shima *et al.*, 2019) se usó la construcción pERV14-GFP para transformarla en la cepa BY4741 *erv14Δ*. La proteína GFP esta fusionada a la proteína Erv14 en su carboxilo terminal y esto nos permitió visualizarla a través de microscopia confocal debido a que una de las propiedades de la GFP es su capacidad de excitarse con un láser de luz a 488 nm y emitir luz en un rango de 514 nm. Con la proteína Erv14 así abanderada en su C-terminal a la GFP se procedió a monitorearla en medios YNB (medio mínimo de crecimiento con 2% de glucosa), YNB-N (medio sin nitrógeno debido a la ausencia de sulfato de amonio), YNB-G (medio sin glucosa) y un medio YNB-N-G (sin glucosa y sin nitrógeno). Los medios YNB-N, YNB-G, YNB-N-G se usaron para activar el proceso de la autofagia debido a que carecen de glucosa y de nitrógeno ya que ambos componentes son importantes para la formación de macromoléculas y el buen funcionamiento de las células. Antes de iniciar con la visualización de la emisión de la fluorescencia de la GFP asociada a Erv14 las células se dejaron crecer por 5 h en los medios ya mencionados, esto porque se tiene reportado que la autofagia inicia a partir de un mínimo de 4 h en medios de cultivo sin nutrientes (Kadowaki *et al.*, 2006). Posterior a esas 5 h de crecimiento de las células se procedió a visualizarlas dentro del Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA-IBt) a través de microscopia confocal. Para ello las células en los diferentes medios se crecieron desfasadas por lo menos 30 min con la finalidad de registrar todas al mismo tiempo de haber sido cultivadas, ya que la adquisición de las imágenes de las células en cada medio de cada uno de los tiempos señalados tomó alrededor de 15 min aproximadamente. El tiempo de la adquisición de las imágenes de las células crecidas en cada uno de los medios

durante los tiempos 0, 1, 2, 3, 4 y 5 h fue de 90 min aproximadamente. En total fueron 360 minutos de microscopia confocal del LNMA-IBt para adquirir las imágenes de todas las células crecidas en los diferentes medios a los distintos tiempos. El número aproximado de imágenes adquiridas para su análisis fue de 700 imágenes que posteriormente fueron analizadas.

Reportes previos muestran que la localización de Erv14 en las levaduras está ciclando entre el RE y el AG (Powers & Barlowe, 2002). El RE en las levaduras se muestra en dos formas, uno al cual se le denomina retículo cortical y se observa muy pegado a la membrana plasmática por lo que su apreciación delimita a la célula de la levadura y el otro es el retículo perinuclear y que se observa alrededor del núcleo (Rubio *et al.*, 2011). En el caso del AG se visualiza como puntos de varios tamaños que muestran movimiento y que en algunos casos están o no asociados al RE (Losev *et al.*, 2006). Al comenzar la visualización de la localización de Erv14-GFP en las células crecidas en condiciones normales (YNB) se aprecia que la proteína está presente en el RE cortical y perinuclear durante el periodo que fue de 0 h hasta las 5 h de incubación (Figura 6; Erv14-GFP-YNB).

En el caso del AG se observó que a partir de las 0 h de incubación la presencia de Erv14 en este organelo es abundante como se puede apreciar la cantidad de puntos dispersos por toda la célula a lo largo de los diferentes tiempos de incubación (Figura 6; Erv14-GFP-YNB), sin embargo, los puntos dejan de apreciarse en número como se puede observar a las 5h de incubación. La localización de Erv14 se observó diferente cuando las células se crecieron en medio sin glucosa (Figura 8; Erv14-GFP-G). Llamó la atención que desde el tiempo 0 se apreció que la localización de Erv14 disminuyó bastante en el AG. Tanto en el RE perinuclear como en el cortical se observó a Erv14. Si bien la magnitud de la emisión de la fluorescencia asociada a Erv14 disminuyó en el RE aun así se logró apreciarlo. También se observó fluorescencia de la GFP asociada a Erv14 dentro de la vacuola desde el tiempo 0 y siendo más notoria a las 2 y 3 h de incubación en el medio YNB-G, lo que nos indicó que la ausencia de glucosa cambió la

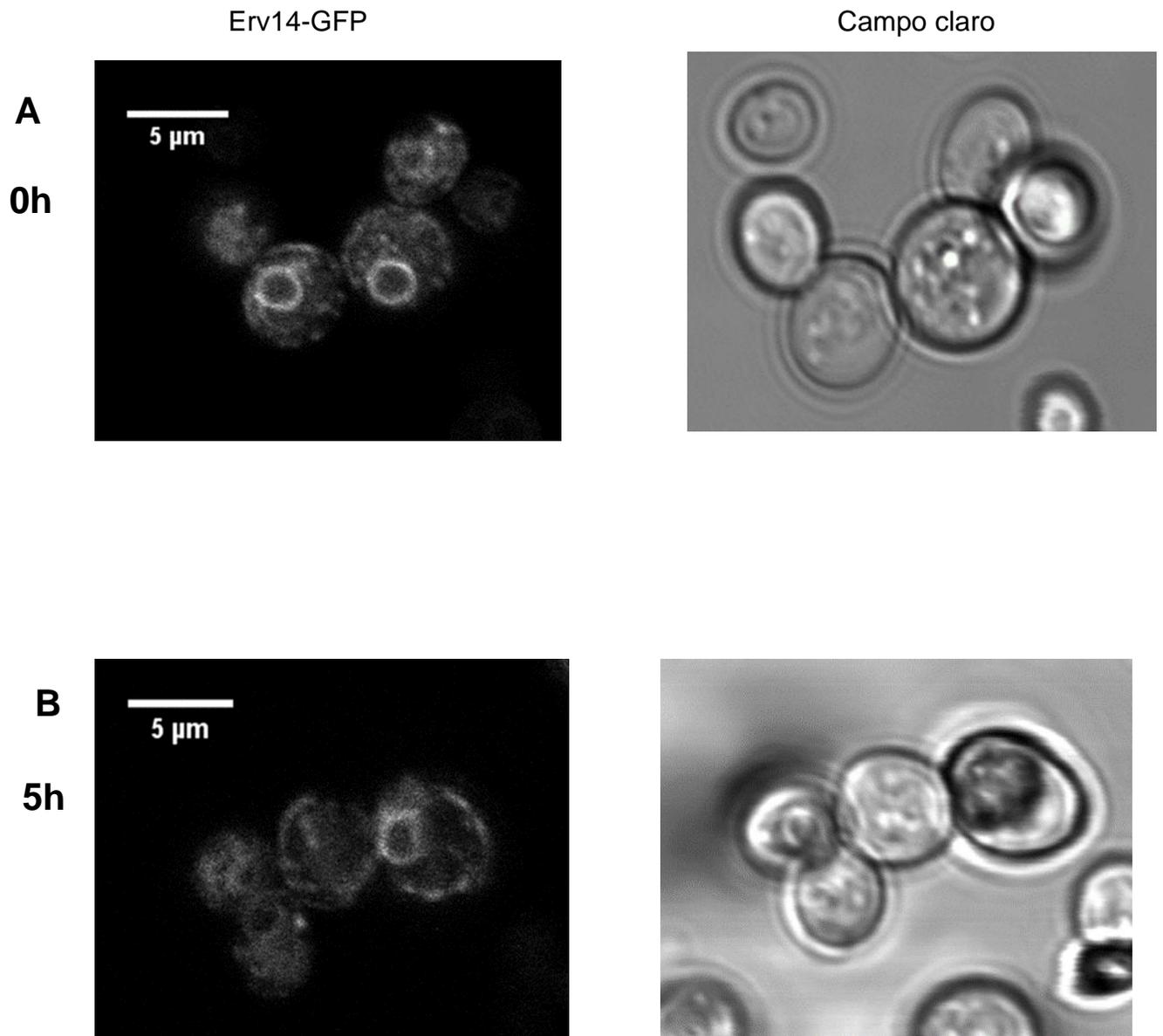
localización de Erv14 (Figura 8; Erv14-GFP-G). En la literatura se reporta que el fagóforo (Arteaga y García, 2017) se aprecia como un punto donde da inicio la formación de los autofagosomas por lo que es probable que Erv14 bajo estas condiciones de crecimiento este formando parte de los autofagosomas ya que se logran apreciar puntos grandes que se asemejan al autofagosoma (Referencias figura con auofagosomas). Cuando las células se crecieron en los medios sin nitrógeno (Figura 9; Erv14-GFP-N) se observó la localización de Erv14 en el RE cortical y perinuclear de manera abundante, mostrándose también la reducción de su localización en el AG y observándose en la mayoría de las células solo un punto a partir de las 2 h de incubación, punto que quizás sea el autofagosoma. También se observó que a partir de las 4 h de incubación la emisión de la fluorescencia de la GFP asociada a Erv14 se localizó en la vacuola (Figura 10; Erv14-GFP-YNB-N). Las imágenes capturadas de las células crecidas en medios sin nitrógeno y sin glucosa (YNB-N-G) mostraron que efectivamente los puntos asociados a lo que se sugiere es el AG disminuyen de manera drástica quedando solo la localización de la proteína Erv14 en RE cortical y perinuclear. De manera similar a las células crecidas en los otros medios sin nitrógeno o sin glucosa, se aprecia la aparición de un solo punto y de la vacuola a partir de 1 h de incubación en YNB-N-G (Figura 10; Erv14-GFP-YNB-NG).



**Figura 6. Erv14 cambia su localización durante el tiempo en ausencia de glucosa o nitrógeno.**

Imágenes de células de levaduras que expresan a la proteína Erv14 fusionada a GFP crecidas en diferentes medios. YNB (medio mínimo), N (sin nitrógeno), G (sin glucosa), NG (sin glucosa y nitrógeno). Se registró la localización de Erv14-GFP cada hora durante 5h de incubación.

Medio normal mínimo

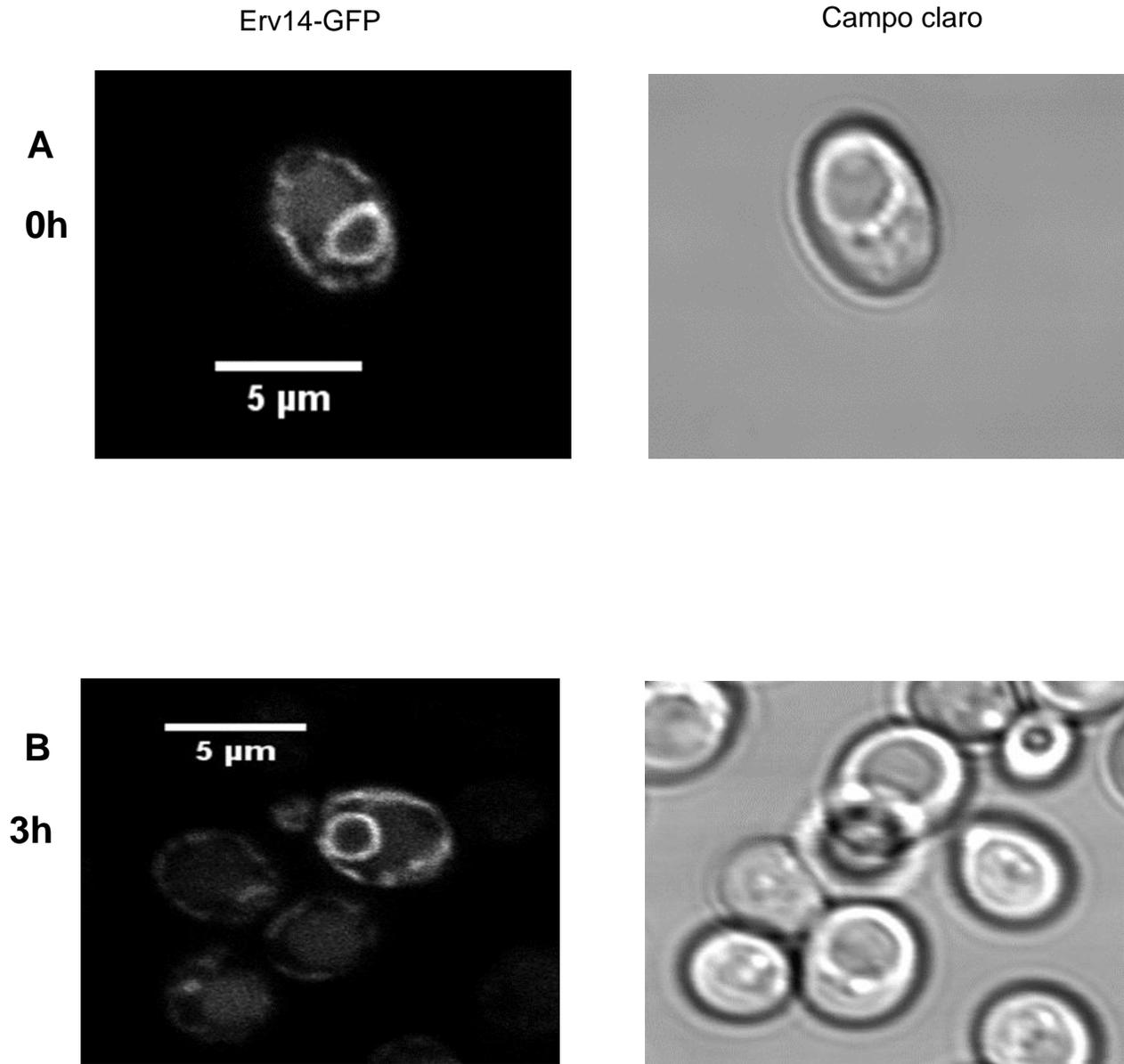


**Figura 7. La localización de Erv14-GFP en medio mínimo disminuyó en el AG a las 5 h de incubación.**

(a) La localización de Erv14 se observó principalmente en el RE cortical y perinuclear y en el AG durante la primera hora de incubación (0h) en medio YNB. (b) A las 5 h de incubación la localización de Erv14 en el AG fue menor

## Medio sin glucosa

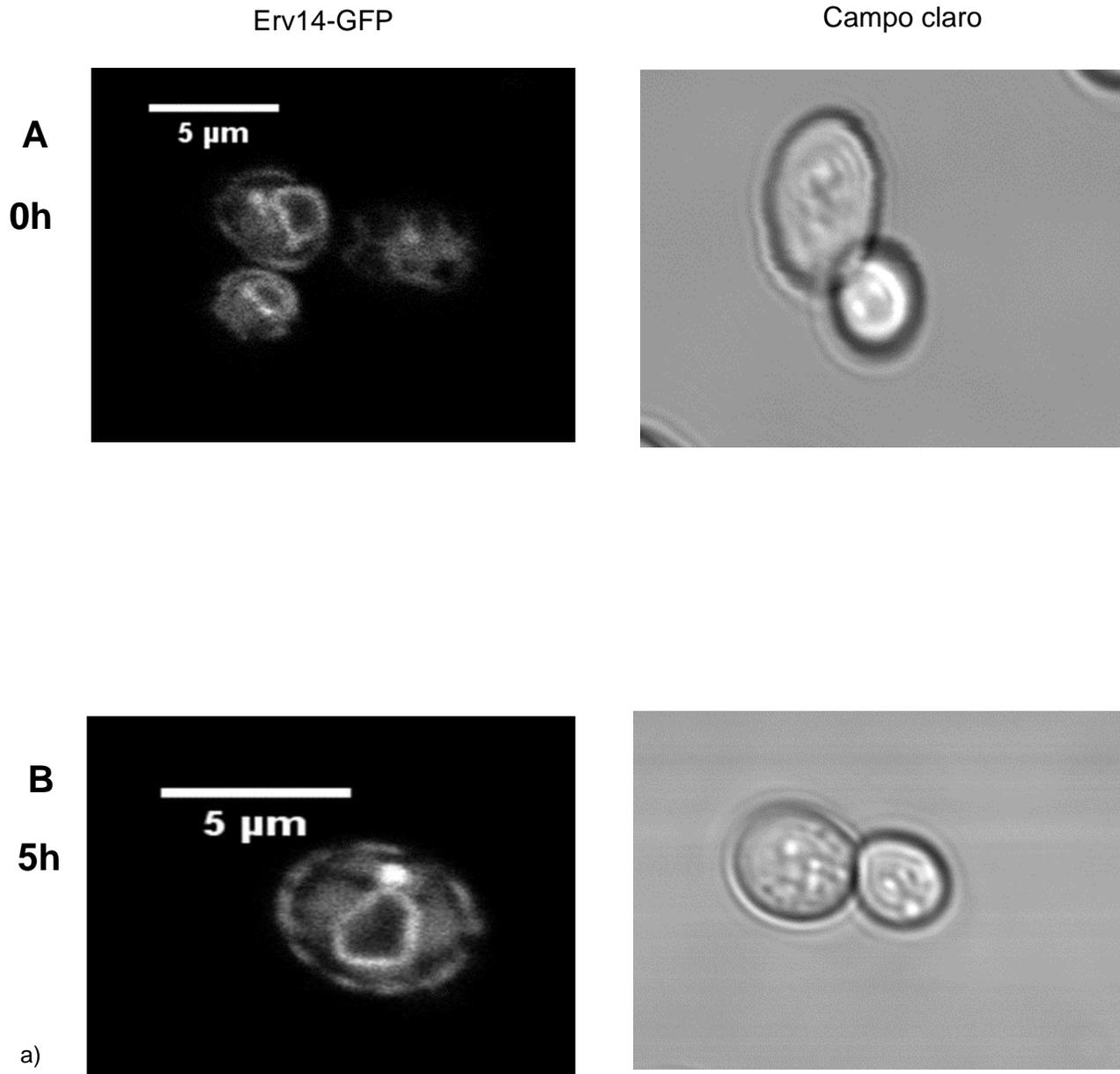
---



**Figura 8. La localización de Erv14-GFP en medio sin glucosa parece estar en el PAS.**

(a) Se observó la localización de Erv14 en el RE cortical y perinuclear de manera abundante. (b) Se observó a las 3h de incubación sin glucosa mayor fluorescencia en el RE cortical y posiblemente en el PAS.

Medio sin nitrógeno

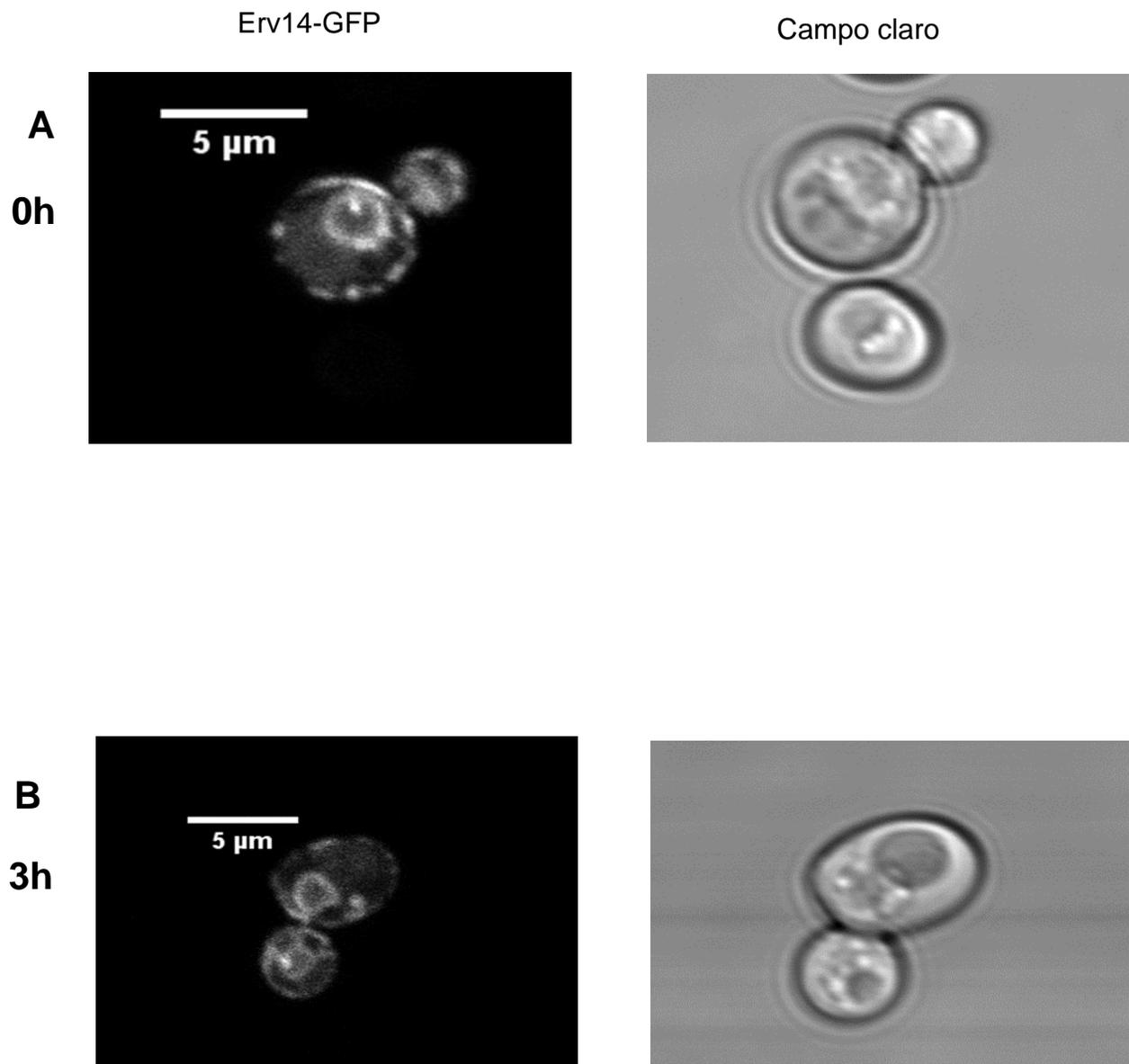


**Figura 9. La localización en de Erv14-GFP en medio sin nitrógeno está en el RE y en la vacuola.**

(a) Los puntos asociados a los que se sugiere es el AG disminuye de manera drástica quedando Erv14 en el RE. La aparición de un solo punto (PAS) y de la vacuola a partir de 0h de incubación (b) A partir de las 4h Erv14 se asoció en la vacuola y retículo perinuclear.

## Medio sin nitrógeno y glucosa

---



**Figura 10. La localización de Erv14-GFP en medio sin nitrógeno y glucosa mostró menor fluorescencia.**

(a) Erv14-GFP a la 0h de incubación se observó su fluorescencia mayormente en retículo perinuclear y también se observaron puntos en el retículo cortical. (b) Erv14-GFP a las 3h de incubación se localizó en el retículo cortical, perinuclear y vacuola.

## 8. DISCUSIÓN

Como hemos visto, en condiciones normales de crecimiento los receptores de carga intervienen en el anclaje de las vesículas COPII producidas en el RE con el compartimento cis del Golgi, y/o en el anclaje de estas vesículas COPII entre sí para la fusión homotípica que se dará lugar en cis-Golgi. Sin embargo, estudios han demostrado que cuando existe en la célula un estrés por falta de nutrientes activa la autofagia cambiando la ruta secretora de las vesículas COPII que en lugar de dirigirse al AG se van hacia el autofagosoma. Un reporte demostró que la proteína Axl2 es una proteína cargo de Erv14 el cual es un receptor de proteínas cargo de una amplia variedad de proteínas de membrana y que tiene una función de selección y montaje de sus cargos dentro de las vesículas tipo COPII (Shima *et al.*, 2019). Otro reporte muestra que TECPR2 es una proteína de unión a ATG8 y un regulador positivo de la autofagia. De manera interesante TECPR2 se asocia y colocaliza junto a distintos componentes de tráfico celular, como lo es la proteína de la capa interna de las vesículas COPII SEC24D. Dicho estudio demostró que TECPR2 se requiere para la estabilización de la abundancia de la proteína SEC24D, del mantenimiento operativo de los sitios de salida del RE (ERES) y de la eficiente exportación de la carga desde el RE que depende de su unión a LC3C lipidado. De manera adicional se mostró que TECPR2 y LC3C son importantes para la formación del autofagosoma probablemente debido a su contribución en el mantenimiento operativo de los ERES. Con todas estas evidencias se reveló que TECPR2 funciona como una plataforma molecular que une la ruta secretoria con la autofagia (Stadel *et al.*, 2015).

Nuestros resultados mostraron que Erv14 posiblemente se asocia y localiza en el PAS, estructura previa a la formación del autofagosoma en condiciones sin nutrientes, que fueron sin nitrógeno, sin glucosa y sin nitrógeno ni glucosa, haciendo que la célula active la autofagia. A través de un marcador como la GFP asociada a Erv14 y se observó la localización de este receptor cargo en la vacuola. También a diferentes tiempos su localización cambió como se mencionó en los resultados (Figura 6; Erv14-GFP-YNB). Estos resultados sugieren que Erv14 si se asocia al autofagosoma, sin

embargo, habría que hacer estudios de co-localización con marcadores del autofagosoma para verificar su localización.

La autofagia es una vía catabólica celular importante en eucariotas, responsable de la degradación de orgánulos y grandes agregados de proteínas. Este proceso se induce bajo diversas condiciones de estrés, como la inanición de aminoácidos, la hipoxia y el estrés oxidativo (Weidberg H, *et al.*, 2011). Con los resultados obtenidos a lo largo de esta tesis y los antecedentes mencionados, el receptor carga Erv14 podría ayudar en la formación del autofagosoma en el proceso de la autofagia en el momento en que las vesículas COPII empiezan a cambiar su ruta secretoria a la autofagica, lo cual conllevaría a la supervivencia de la célula, como lo hacen los demás genes y proteínas que participan en la formación del autofagosoma. La forma en que Erv14 contribuye a esto se necesita elucidar empleando quizás estudios proteómicos para determinar si es que Erv14 se asocia con proteínas que ayuden en la expansión de la membrana del autofagosoma.

Otro reporte mostró una función poco convencional para un complejo de adaptadores de carga COPII, Lst1-Sec23, al revelar ciertos dominios del RE que participan en la autofagia. Este tipo de autofagia en el retículo endoplásmico se le conoce como ER-phagy (autofagia del retículo endoplásmico) y esta mediada por Lst1-SEC23. La ER-phagy esta inducida por la privación de nutrientes y usa receptores residentes del RE. Este tipo de autofagia necesita de unirse al RE en ciertas regiones que son estabilizadas por la proteína Lnp1 y que se les conoce como sitios de la ER-phagy (ERPHS). Se descubrió que los ERPHS son distintos de los sitios de salida del RE que contienen Sec24-Sec23 (ERES) y que generan las vesículas de transporte canónicas recubiertas por las proteínas COPII. Lo que indica este estudio es que los adaptadores de carga COPII empaquetan cargas distintas en ciertos dominios de la membrana del RE y que luego se dirigen a vías específicas ya sea a la ER-phagy o la ruta secretora. Los complejos adaptadores de carga Lst1 / Sec24C-Sec23 y Sec24-Sec23 podrían clasificar sus distintas cargas a través de una interacción con el dominio citoplásmico de

una proteína transmembrana del RE. Estas distintas rutas de tráfico del RE están reguladas por rutas independientes de respuesta al estrés. La ER-phagy depende de reguladores transcripcionales de autofagia dependientes de TOR, mientras que la homeostasis de las proteínas en la vía secretora está modulada por la UPR. Por lo tanto, los reguladores transcripcionales de autofagia dependientes de TOR también pueden modular la regulación positiva de los receptores de ER-phagy para reducir la agregación de proteínas del RE. Esto implica que un subcomplejo específico de la capa COPII que contiene Lst1-Sec23 se une a Atg40 para empaquetar los dominios del RE en autofagosomas durante la ER-phagy. La ruta secretora y la ER-phagy también parecen estar reguladas por diferentes vías de respuesta al estrés; La homeostasis de las proteínas en donde participa la ruta secretora está regulada por UPR, mientras que la ER-phagy depende de los reguladores transcripcionales de la autofagia dependientes de TOR (Cui *et al.*, 2019).

Varios son los estudios que han dilucidado las funciones moleculares de las proteínas Atg y sus acciones concertadas, que están altamente conservadas en levaduras y mamíferos (Nakatogawa *et al.*, 2009; Mizushima *et al.*, 2011). No obstante, los mecanismos moleculares que subyacen a la formación del autofagosoma, sobre todo aquellos que contribuyen a la formación de la membrana autofagosomal siguen siendo enigmáticos. Los estudios realizados en este proyecto nos ayudaron a evaluar si el receptor cargo Erv14 cambió su localización del RE a la vacuola presumiblemente a través del autofagosoma. Para lo cual se observaron por microscopía confocal a células de levadura que expresaron la fusión traduccional de Erv14 a GFP. Las células se monitorearon durante 5h en diferentes medios (YNB, YNB-N, YNB-G, YNB-NG) para observar que su localización durante un estrés por falta de nutrientes es diferente. Utilizamos este sistema para determinar si Erv14 cambió su localización habitual (RE-COPII) a la vacuola y en lo que quizás podría ser el autofagosoma. En la literatura está reportado que Axl2 es una proteína carga de Erv14 y que ambos están localizados en las vesículas COPII (Powers y Barlowe, 1998).

Posteriormente otro estudio en levaduras demostró que al usar una cepa sensible a temperatura (*sec12<sup>ts</sup>*) se permite la formación de las vesículas COPII solo a bajas temperaturas (23°C). Este sistema les permitió usar un plásmido con un promotor activado por calor (SSA) que permite la transcripción a 37°C de la proteína Axl2 fusionada a GFP. De esta manera cuando las células se incubaron a 37 °C durante 1h, se inició la producción y acumulación de Axl2-GFP en el RE. Posteriormente las células se incubaron a 23°C en presencia de rapamicina (un activador de la autofagia) permitiendo la producción de las vesículas COPII e inhibiendo la síntesis de Axl2-GFP y al mismo tiempo se observó la ruta que tomaron las vesículas COPII durante la activación de la autofagia por la presencia de rapamicina (Shima *et al.*, 2019). Lo reportado muestra que Axl2-GFP se localiza en estructuras del autofagosoma de una manera dependiente de Erv14 ya que se visualizó la fluorescencia de la GFP asociada a Axl2 en puntos que colocalizaron con Atg8, un marcador de las estructuras del autofagosoma. En la cepa mutante de ERV14 (*erv14Δ*) se observó que la salida del cargo Axl2-GFP del RE estaba casi completamente bloqueada en células que carecían de Erv14, observándose su localización en el retículo perinuclear y en el retículo cortical (Shima *et al.*, 2019) y además de que Axl2 no colocalizó con los autofagosomas. Estos resultados nos mostraron que Erv14 era necesario para que el cargo Axl2 durante la autofagia lograra introducirse al autofagosoma. La presente tesis intentó elucidar si Erv14 contribuye o no a la formación del autofagosoma y no solamente a dirigir al cargo a su interior. Esta hipótesis se basa en la evidencia que se tiene sobre los múltiples cargos que Erv14 posee (Herzig *et al.*, 2012) y los cuales tienen funciones importantes en la célula (Rosas-Santiago *et al.*, 2015; Zimmermannová *et al.*, 2019) con lo cual la función de Erv14 no es directa en la construcción de los organelos como tal, pero sí de proveer las proteínas que los hacen funcionales, siendo entonces Erv14 una proteína con cierta relevancia para el establecimiento correcto de los organelos.

Conforme a los antecedentes mencionados anteriormente, nuestros resultados sugieren que la proteína cargo Erv14 cambia de localización a la vacuola probablemente a través de estructuras del autofagosoma en condiciones de estrés a falta de nutrientes, como

se muestra en las imágenes de microscopía confocal (Figura 6; Erv14-GFP-YNB). Las observaciones de la proteína Erv14-GFP muestran que desde la hora uno en el medio YNB-N se observó la localización de Erv14 en el RE cortical y perinuclear de manera abundante, mostrándose también la reducción de su localización en el AG y observándose en la mayoría de las células solo un punto a partir de las 2 h de incubación (Shima *et al.*, 2019). En la literatura la aparición de un solo punto está relacionada con los autofagosomas. También en el medio YNB-G (sin glucosa) se observó cambios en la localización de Erv14-GFP hacia la vacuola. Con esto concluimos que Erv14 si cambia su localización de una ruta secretora normal a la vacuola ante una respuesta de estrés a falta de nutrientes.

Los estudios de la localización de la proteína Erv14 a través de anticuerpos y el fraccionamiento de las membranas mediante el free flow contribuiría a elucidar mejor este cambio de localización de la proteína carga Erv14 a la vacuola y quizás al autofagosoma, por lo que realizar estudios de localización a través de un fraccionamiento membranal mediante la electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) permitiría identificar si las membranas a las que se asocia Erv14 cambian de acuerdo a las condiciones de crecimiento.

En un futuro se podrían realizar ensayos de inmunoprecipitación para conocer si Erv14 contribuye a la autofagia ya que es posible que algunas proteínas con las que se asocie durante los periodos de inanición tengan que ver con la autofagia, para esto es necesario conocer las proteínas que interactúan con Erv14 en periodos de escases de nutrientes, por lo que realizar estudios de inmunoprecipitación contribuirá a la elucidación de esta hipótesis.

## 9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos de Erv14-GFP en condiciones normales (YNB-medio mínimo) mostraron la localización de Erv14 en retículo cortical y perinuclear y en el aparato de Golgi, sin embargo, cuando incubamos en un medio a las levaduras que indujo la autofagia por la falta de nutrientes como la glucosa o el nitrógeno se observó un cambio de la fluorescencia de la GFP asociada a Erv14 al interior de la vacuola.

Estos experimentos nos indican que las condiciones de crecimiento que activan la autofagia permiten que Erv14 cambie su localización de la ruta anterógrada hacia la vacuola, quizás a través de los autofagosomas.

## **10. PERSPECTIVAS**

### **10.1 Demostrar si el cambio de localización de Erv14 corresponde a estructuras del autofagosoma**

El cambio de la localización de Erv14 del RE y del AG a un solo punto, presumiblemente el fagóforo y a la vacuola, cuando las células se crecen en medios deficientes de nutrientes y debido a la evidencia previa que muestra que las vesículas COPII proveen de membrana a los autofagosomas, hace suponer que Erv14 podría estar participando en el proceso de formación del autofagosoma, por lo que llevar estudios de localización a través de un fraccionamiento membranal mediante la electroforesis zonal de flujo libre (EZFL) permitiría identificar si las membranas a las que se asocia Erv14 cambian de acuerdo a la condiciones de crecimiento.

### **10.2 Determinar si Erv14 interactúa con proteínas del autofagosoma durante la falta de nutrientes**

La evidencia de Erv14 como receptor cargo de un gran número de proteínas cargo, de su cambio de localización en condiciones de crecimiento deficientes en nutrientes y de las membranas de las vesículas COPII, a las cuales se asocia cuando sucede la ruta anterógrada y que en condiciones deficientes de nutrientes proveen de membrana al autofagosoma, sugiere que Erv14 podría estar participando dentro del proceso de la autofagia siendo posible que algunas proteínas con las que se asocia durante los periodos de inanición tengan que ver con la autofagia. Para conocer si Erv14 pudiera realizar este papel es necesario conocer las proteínas que interactúan con Erv14 en periodos de escasez de nutrientes, por lo que se propone realizar estudios de inmunoprecipitación para conocer estas posibles proteínas.

## 11.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera-Romero A, Kaminska J, Spang A, Riezman H, Muniz M (2008) The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *The Journal of cell biology* 180: 713-720
- Amoasii, L.; Bertazzi, DL; Tronchere, H.; Hnia, K.; Chicanne, G.; Rinaldi, B.; Carenado, BS; Ferry, A.; Klaholz, B.; Payrastre, B.; (2012) La miotubularina muerta por fosfatasa mejora los fenotipos de miopatía centronuclear ligada al cromosoma X en ratones. *PLoS Genet.*, 8, e1002965.
- Antonny, B., Madden, D., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. (2001). Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nat Cell Biol.* 3(6): 531 – 537.
- Arteaga S.M. y García M.I., (2017) Embriología Humana y Biología del Desarrollo. (2a ed.). Cd México, México: Panamericana
- Balch, W. E., McCaffery, J. M., Plutner, H., & Farquhar, M. G. (1994). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 76(5), 841-852.
- Bard, F.; Malhotra, V. The formation of tgn-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2006, 22, 439–455.
- Barlowe, C. K., d'Enfert, C., Schekman, R. (1993). Purification and characterization of SAR1p, a small GTPbinding protein required for transport vesicle formation from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 268(2): 873 – 879
- Barlowe, C. K., Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics.* 193: 383 – 410.

- Belden WJ, Barlowe C (2001) Role of Erv29p in collecting soluble secretory proteins into ERderived transport vesicles. *Science* 294: 1528-1531
- Belden, W.J. Barlowe, C. (2001) Distinct roles for the cytoplasmic tail sequences of emp24p and erv25p in transport between the endoplasmic reticulum and golgi complex. *J. Biol. Chem.*, 276, 43040–43048
- Bhattacharya, N., Jason, O., & Stagg, S. M. (2012). The structure of the Sec13/31 COPII cage bound to Sec23. *Journal of molecular biology*, 420(4-5), 324-334.
- Bi, X., Mancias, J. D., & Goldberg, J. (2007). Insights into COPII Coat Nucleation from the Structure of Sec23•Sar1 Complexed with the Active Fragment of Sec31. *Developmental Cell*, 13(5), 635–645. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.10.006>
- Biddick R, Young ET (2009) The disorderly study of ordered recruitment. *Yeast* 26: 205–220
- Bock, J. B., Matern, H. T., Peden, A. A., & Scheller, R. H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature*, 409(6822), 839-841.
- Bonifacino JS, Glick BS (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153-166
- Bonifacino, J. S. (2014). Adaptor proteins involved in polarized sorting. *J Cell Bio.* 204(1): 7 – 17.
- Boya P., Codogno P., y Rodriguez-Muela N. (2018) Autophagy in stem cells: repair, remodelling and metabolic reprogramming. *The Company of Biologists* doi: 10.1242/dev.146506

- Brandizzi, F., y Barlowe, C. (2013). Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 382-392.
- Brocard-Masson C, Dumas B (2006). The fascinating world of steroids: *S. cerevisiae* as a model organism for the study of hydrocortisone biosynthesis. *Biotechnol Genet Eng Rev* 22: 213–252
- Bue CA, Bentivoglio CM, Barlowe C (2006) Erv26p directs pro-alkaline phosphatase into endoplasmic reticulum-derived coat protein complex II transport vesicles. *Molecular biology of the cell* 17: 4780-4789
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007a) Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell* 12: 671-682
- Castillon G. A, Watanabe R, Taylor M, Schwabe T. M. E, Riezman H (2009) Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic* 10: 186–200.
- Choi Y, Bowman JW, Jung JU. (2018). Autophagy during viral infection — a double-edged sword. *Nature reviews in microbiology*. doi: 10.1038/s41579-018-0003-6.
- Cohen M, Stutz F, Belgareh N, Haguenaer-Tsapis R, Dargemont C (2003) Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol* 5: 661-667
- Conibear, E. (2010) Converging views of endocytosis in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 22, 513–518

- Cui, Y., Parashar, S., Zahoor, M., Needham, P. G., Mari, M., Zhu, M., Ferro-Novick, S. (2019). A COPII subunit acts with an autophagy receptor to target endoplasmic reticulum for degradation. *Science*, 365(6448), 53–60. <https://doi.org/10.1126/science.aau9263>
- d'Enfert, C., Wuestehube, L. J., Lila, T., Schekman, R. 1991. Sec12p-dependent membrane binding of the small GTP-binding protein Sar1p promotes formation of transport vesicles from the ER. *J Cell Biol.* 114(4): 663 – 670.
- Dancourt, J.; Barlowe, C. Protein sorting receptors in the early secretory pathway. (2010) *Annu. Rev. Biochem* 79, 777–802.
- D'Arcangelo JG, Stahmer KR, Miller EA (2013) Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochimica et biophysica acta* 1833: 2464-2472
- Donohoe, B.S., Kang, B.H., Gerl, M.J., Gergely, Z.R., McMichael, C.M., Bednarek, S.Y., and Staehelin, L.A. (2013). Cis-Golgi cisternal assembly and biosynthetic activation occur sequentially in plants and algae. *Traffic* 14, 551-567.
- Duden, R., Griffiths, G., Frank, R., Argos, P., & Kreis, T.E., (1991). Beta-COP, a 110 kd protein associated with non-clathrin-coated vesicles and the Golgi complex, shows homology to beta-adaptin. *Cell.* 64(3): p. 649-65
- Engel, A., Gaub, H. E. (2008). Structure and mechanics of membrane proteins. *Annu Rev Biochem.* 77: 127 –148.
- Ennis, I. (n.d.). Capítulo 16 Receptores y mecanismos de transducción de señales. Retrieved from <http://www.saha.org.ar/pdf/libro/Cap.016.pdf>

- Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res.* (2014); 24:24–41. doi: 10.1038/cr.2013.168
- Feyder S., De Craene J.O., Bär S., Bertazzi D. y Friant S. (2015). Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Int. J. Mol. Sci.* 16(1), 1509-1525; <https://doi.org/10.3390/ijms16011509>
- Furgason ML, MacDonald C, Shanks SG, Ryder SP, Bryant NJ, Munson M (2009) The N-terminal peptide of the syntaxin Tlg2p modulates binding of its closed conformation to Vps45p. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 14303- 14308
- Galluzzi, L., Maiuri, M., Vicencio, J., Kepp, O., Tasdemir, E., & Kroemer, G. (2008). To Die or Not to Die: That is the Autophagic Question. *Current Molecular Medicine*, 8(2), 78–91. <https://doi.org/10.2174/156652408783769616>
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R. W., Belle, A., Dephoure, N., Weissman, J. S. (2003). Global analysis of protein expression in yeast. *Nature*, 425(6959), 737–741. <https://doi.org/10.1038/nature02046>
- Gil Á., Aguilera C.M., Martínez A.O. (2017) Tratado de Nutrición (3ra ed.) Cd. México, México: Pamericana
- Glick, B.S. & Luini, A., (2011). Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(11): p. a005215
- Guo JY, White E. (2016) Autophagy, metabolism, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*; 81: 73-8

- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141(4), 656-667.
- Hanton, S. L., Bortolotti, L. E., Renna, L., Stefano, G., & Brandizzi, F. (2005). Crossing the Divide - Transport Between the Endoplasmic Reticulum and Golgi Apparatus in Plants. *Traffic*, 6(4), 267–277. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00278.x>
- Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. L. Guan, and N. Mizushima. (2008). FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.*181:497-510
- Hardie, D. G. (2007). AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 774–785. <https://doi.org/10.1038/nrm2249>
- Herzig, Y., Sharpe, H. J., Elbaz, Y., Munro, S., & Schuldiner, M. (2012). A Systematic Approach to Pair Secretory Cargo Receptors with Their Cargo Suggests a Mechanism for Cargo Selection by Erv14. *PLoS Biology*, 10(5), e1001329. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001329>
- Hohmann, S., Krantz, M., & Nordlander, B. (2007). Yeast Osmoregulation. *Methods in Enzymology*, 29–45. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(07\)28002-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(07)28002-4)
- Huynh, K. K., Eskelinen, E.-L., Scott, C. C., Malevanets, A., Saftig, P., & Grinstein, S. (2007). LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes. *The EMBO Journal*, 26(2), 313–324. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601511>

- Inadome H, Noda Y, Adachi H, Yoda K (2005) Immunoprecipitation of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Molecular and cellular biology* 25: 7696-7710
- Jin, S., & White, E. (2007). Role of Autophagy in Cancer: Management of Metabolic Stress. *Autophagy*, 3(1), 28–31. <https://doi.org/10.4161/auto.3269>
- Kadowaki, M., Karim, M. R., Carpi, A., & Miotto, G. (2006). Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Molecular aspects of medicine*, 27(5-6), 426-443
- Karanasios, E., Stapleton, E., Maniava, M., Kaizuka, T., Mizushima, N., Walker, S. A., & Ktistakis, N. T. (2013). Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *Journal of Cell Science*, 126(22), 5224–5238. <https://doi.org/10.1242/jcs.132415>
- Kimura, S., Noda, T., & Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes. *Cell Structure and Function*, 33(1), 109–122. <https://doi.org/10.1247/csf.08005>
- Klecker, T., Bockler, S., Westermann, B. (2014). Hacer conexiones: los contactos interorganelos orquestan el comportamiento mitocondrial. *Trends Cell Biol.*, 24, 537–545.
- Klionski, D. J. y S.D. Emr (2000). Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290(5497): 1717-21.

- Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T. K. and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* 9, 1491–1499. doi:10.4161/auto.25529
- Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., & Peter, M. (2008). Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature Cell Biology*, 10(5), 602–610. <https://doi.org/10.1038/ncb1723>
- Lee, I. H., & Finkel, T. (2009). Regulation of Autophagy by the p300 Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(10), 6322–6328. <https://doi.org/10.1074/jbc.m807135200>
- Lee, J. W., Park, S., Takahashi, Y., & Wang, H.-G. (2010). The Association of AMPK with ULK1 Regulates Autophagy. *PLoS ONE*, 5(11), e15394. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015394>
- Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the er and golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20(1), 87–123. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307>
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Lodish, H; Berk A; Kaiser, C.A; Krieger, M; Bretscher A; Ploegh, H; Amon, A; Scott, M.P. (2016) *Biología Celular y Molecular*

- Lopez-Mirabal HR, Winther JR (2008) Redox characteristics of the eukaryotic cytosol. *Biochim Biophys Acta* 1783: 629–640
- Lord C, Bhandari D, Menon S, Ghassemian M, Nycz D, Hay J, Ghosh P, Ferro-Novick S (2011) Sequential interactions with Sec23 control the direction of vesicle traffic. *Nature* 473: 181-186
- Luo, F., Fong, Y. H., Zeng, Y., Shen, J., Jiang, L., and Wong, K. B. (2014). How vacuolar sorting receptor proteins interact with their cargo proteins: crystal structures of apo and cargo-bound forms of the protease-associated domain from an Arabidopsis vacuolar sorting receptor. *Plant Cell* 26, 3693-3708. Marti, L., Fornaciari
- Malkus P, Jiang F, Schekman R (2002) Concentrative sorting of secretory cargo proteins into COPII-coated vesicles. *The Journal of cell biology* 159: 915-921
- Manzano-Lopez J, Perez-Linero AM, Aguilera-Romero A, Martin ME, Okano T, Silva DV, Seeberger PH, Riezman H, Funato K, Goder V, Wellinger RE, Muniz M (2015) COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Current biology: CB* 25: 152- 162
- Matsuoka, K., Orci, L., Amherdt, M., Bednarek, S. Y., Hamamoto, S., Schekman, R., Yeung, T. (1998). COPII coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*. 93(2): 263 – 275.
- Matsuoka, K., Schekman, R., Orci, L., Heuser, J. E. (2001). Surface structure of the COPII-coated vesicle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98(24): 13705 – 13709.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., & Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, 20(7), 748–762. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.82>

- Melendez, A., Z. Tallochy, M. Seaman, E. L. Eskelinen, D. H. Hall, B. Levine. (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301:1387-1391
- Mijaljica, D., Prescott, M., & Devenish, R. J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), 673–682. <https://doi.org/10.4161/auto.7.7.14733>
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L., Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*. 114(4): 497 – 509.
- Miller-Fleming L, Giorgini F, Outeiro TF (2008) Yeast as a model for studying human neurodegenerative disorders. *Biotechnol J* 3: 325–338
- Mizushima, N., & Levine, B. (2010). Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature Cell Biology*, 12(9), 823–830. <https://doi.org/10.1038/ncb0910-823>
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. et al. (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069–1075. Doi: 10.1038/nature06663
- Mossessova, E., Blickford, L. C., Goldberg, J. (2003). SNARE selectivity of the COPII coat. *Cell*. 114(4): 483 – 95.
- Muniz, M., & Zurzolo, C. (2014). Sorting of GPI-anchored proteins from yeast to mammals - common pathways at different sites? *Journal of Cell Science*, 127(13), 2793–2801. <https://doi.org/10.1242/jcs.148056>

- Muñiz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001). Protein Sorting upon Exit from the Endoplasmic Reticulum. *Cell*, 104(2), 313–320. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00215-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00215-x)
- Murakami, C., & Kaeberlein, M. (2009). Quantifying Yeast Chronological Life Span by Outgrowth of Aged Cells. *Journal of Visualized Experiments*, (27). <https://doi.org/10.3791/1156>
- Nakano, A., Brada, D., & Schekman, R. (1988). A membrane glycoprotein, Sec12p, required for protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus in yeast. *Journal of Cell Biology*, 107(3), 851–863. <https://doi.org/10.1083/jcb.107.3.851>
- Nakano, A., Muramatsu M. (1989). A novel GTP-binding protein, Sar1p, is involved in transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus. *J Cell Biol.* 109(6): 2677 – 2691.
- Nasheuer HP, Smith R, Bauerschmidt C, Grosse F, Weissbart K (2002) Initiation of eukaryotic DNA replication: regulation and mechanisms. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 41–94
- Noda Y, Yoda K (2010) Svp26 facilitates endoplasmic reticulum to golgi transport of a set of mannosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 285: 15420-15429
- Owsianowski E, Walter D, Fahrenkrog B (2008) Negative regulation of apoptosis in yeast. *Biochim Biophys Acta* 1783: 1303–1310

- Pagant, S., Wu, A., Edwards, S., Diehl, F., Miller, E. A. (2015). Sec24 is a coincidence detector that simultaneously binds two signals to drive ER export. *Curr Biol.* 25(4): 403 – 412.
- Park, M., y Jurgens, G. (2012). Membrane traffic and fusion at post-Golgi compartments. *Front. Plant. Sci.* 2, 111.
- Pelham, H.R. & Rothman, J.E., (2000). The debate about transport in the Golgi--two sides of the same coin? *Cell.* 102(6): p. 713-9.
- Peng R, Gallwitz D (2002) Sly1 protein bound to Golgi syntaxin Sed5p allows assembly and contributes to specificity of SNARE fusion complexes. *The Journal of cell biology* 157: 645-655
- Pfeffer, S. R. (2013). A Prize for Membrane Magic. *Cell*, 155(6), 1203–1206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.014>
- Powers J., Barlowe, C. (1998). Transport of Axl2p depends on Erv14p, an ER-Vesicle protein related to the Drosophila cornichon gene product. *J Cell Biol.* 142(5): 1209–1222.56
- Powers J., Barlowe, C. (2002). Erv14p directs a transmembrane secretory protein into COPII-coated transport vesicles. *Mol Biol Cell.* 13(3): 880 – 891
- Queenan A.M., Barcelo G., Van Buskirk C., Schupbach T. (1999). The transmembrane region of Gurken is not required for biological activity, but is necessary for transport to the oocyte membrane. *Mech. Dev.* 89, 35-42.

- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*, 12(8), 747-757.
- Robinson, D.G., Herranz, M.C., Bubeck, J., Pepperkok, R., and Ritzenthaler, C. (2007). Membrane Dynamics in the Early Secretory Pathway. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 199-225.
- Rodríguez M.A, García P.A., Egido de los Ríos J., Lamas P.S., Praga .M, Serón D. (2013) Hernando. Nefrología Clínica (4<sup>a</sup> ed) Cd. México, México: Panamericana
- Roemer, T., K. Madden, J. Chang, and M. Snyder. (1996). Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev.* 10:777–793. <https://doi.org/10.1101/gad.10.7.777>
- Román-Fernández, A., & Bryant, D. M. (2016). Complex Polarity: Building Multicellular Tissues through Apical Membrane Traffic. *Traffic*, 17(12), 1244–1261. <https://doi.org/10.1111/tra.12417>
- Rosas-Santiago, P., Lagunas-Gomez, D., Barkla, B. J., Vera-Estrella, R., Lalonde, S., Jones, A., Frommer, W. B., Zimmermannova, O., Sychrova, H., Pantoja, O. (2015). Identification of rice cornichon as a possible cargo receptor for the Golgi-localized sodium transporter OshKT1; 3. *J Exp Bot.* 66(9): 2733 – 2748.
- Rosas-Santiago, P., Zimmermannova, O., Vera-Estrella, R., Sychrová, H., Pantoja, O. (2016). Erv14 cargo receptor participates in yeast salt tolerance via its interaction with the plasma-membrane Nha1 cation/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta.* 1858(1): 67 – 74.

- Roth S., Neuman-Silberberg F.S., Barcelo G., Schübach T. (1995). Cornichon and the EGF receptor signaling processes are necessary for both anterior-posterior and dorsal-ventral pattern formation in *Drosophila*. *Cell* 81, 967-978.
- Rubinsztein, D. C., Shpilka, T., & Elazar, Z. (2012). Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Current Biology*, 22(1), R29–R34.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.034>
- Rubio, Claudia et al. 2011. “Homeostatic Adaptation to Endoplasmic Reticulum Stress Depends on Ire1 Kinase Activity.” *Journal of Cell Biology* 193(1): 171–84.
- Sakai, Y.; Oku, M.; Van Der Klei, I.J. Y Kiel, J.A. (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1763: 1767-1775.
- Schwenk, J., Harmel, N., Zolles, G., Bildl, W., Kulik, A., Heimrich, B., ...Klocker, N. (2009). Functional Proteomics Identify Cornichon Proteins as Auxiliary Subunits of AMPA Receptors. *Science*, 323(5919), 1313–1319.  
<https://doi.org/10.1126/science.1167852>
- Sharpe, H. J., Stevens, T. J., & Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell*, 142(1), 158-169.
- Shima, T., Kirisako, H., & Nakatogawa, H. (2019). COPII vesicles contribute to autophagosomal membranes. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1503–1510.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.201809032>
- Spang, A., Herrmann, J.M., Hamamoto, S., & Schekman, R., (2001). The ADP ribosylation factor-nucleotide exchange factors Gea1p and Gea2p have

overlapping, but not redundant functions in retrograde transport from the Golgi to the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 12(4): p. 1035-45.

Stadel, D., Millarte, V., Tillmann, K. D., Huber, J., Tamin-Yecheskel, B.-C., Akutsu, M., ... Behrends, C. (2015). TECPR2 Cooperates with LC3C to Regulate COPII-Dependent ER Export. *Molecular Cell*, 60(1), 89–104. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.09.010>

Stagg, S. M., Gürkan, C., Fowler, D. M., LaPointe, P., Foss, T. R., Potter, C. S., ... & Balch, W. E. (2006). Structure of the Sec13/31 COPII coat cage. *Nature*, 439(7073), 234-238.

Stagg, S. M., LaPointe, P., Razvi, A., Gürkan, C., Potter, C. S., Carragher, B., & Balch, W. E. (2008). Structural basis for cargo regulation of COPII coat assembly. *Cell*, 134(3), 474-484.

Suda, Y., Nakanishi, H., Mathieson, E. M., & Neiman, A. M. (2007). Alternative Modes of Organellar Segregation during Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell*, 6(11), 2009–2017. <https://doi.org/10.1128/ec.00238-07>

Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T.y Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* 119, 301–311. 20.

Tomoda, T., R. S. Bhatt, H. Kuroyanagi, T. Shirasawa, and M. E. Hatten. (1999). A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons. *Neuron* 24:833-846

- Tsukada, M., & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 333(1–2), 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e)
- Weidberg H, Shvets E, Elazar Z (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem*, 80: 125-156. 10.1146/annurev-biochem-052709-094552
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*, 29: 1792-1802. 10.1038/emboj.2010.74
- Yang, Z., Klionsky, D. (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12, 814–822 doi:10.1038/ncb0910-814
- Yoshihisa, T., Barlowe, C., Schekman, R. (1993). Requirement for a GTPase-activating protein in vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Science*. 259(5100): 1466 – 1468.
- Zhang, J (2015). Teaching the basics of autophagy and mitophagy to redox biologists- mechanisms and experimental approaches. *Redox Biol* 4: 242-59,

Cuernavaca, Morelos a 11 de octubre de 2021

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE**  
**DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**P R E S E N T E.**

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **NAYELI IMELDA ROLDÁN RAMÍREZ**, con el título del trabajo: **LA FALTA DE NUTRIENTES CAMBIA LA LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA ERV14 DE LAS VESÍCULAS COPII AL AUTOFAGOSOMA.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

**A T E N T A M E N T E**  
*Por una humanidad culta*

**JURADO REVISOR**

**FIRMA**

PRESIDENTE: DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ

\_\_\_\_\_

SECRETARIO: M. EN C. MARIA LUISA BARROSO GARCIA

\_\_\_\_\_

VOCAL: DR. PAUL ROSAS SANTIAGO

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: M. EN C. LAURA PATRICIA LINA GARCIA

\_\_\_\_\_

SUPLENTE: DRA. MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ

\_\_\_\_\_



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**PAUL ROSAS SANTIAGO | Fecha:2021-10-11 17:37:43 | Firmante**

cL7fuiSK6HnbBFCCv1FyCyg2jcrKBlbP4dtJqrpF0Znx9Ca2Uij751YQXRMZ8D311DIQ8BAXc2RTqb7JYQLx2SKe3gFcVUG/8imOK3iVoElbYh8ZeQkbBb1xb03SUnGm27Ei16mbiETEOLUguxdKScVpss7f563k2wK5Jx0yzzlqKOnHuieSnBX6RXTc+1ko4qfiQBjp99DET48L8iZuNj4IVwuPKbIMtk+kN8ibWEIOonE00VosuDNE/zaPBflu3DvnlxGRVtmdhbsQijIiwBbHvF5878e8meRZHYaYzxAxb3mB0KkpKknwM2tNjDt9QkvboEd++ZtoSbcvW1JQ==

**LAURA PATRICIA LINA GARCIA | Fecha:2021-10-11 20:47:28 | Firmante**

AOvYAtRDhuti66/sLVXp6MatWd32vSBptgKGVkD/6AAXloYgVsVXTuTo11sCv6xXQY0C2GiiEOK54iME3ODcXH2Cj++JINTBr8Mw4lwiOWsdjQYoyHZv9BWw2DOITcy29N3Cnj5nWVC4tOB69Z969MIHgus1oTaOeY5To0VD5sG025hm+nsMRGBm6oNwosOwRKuNgBhgLcy797bJwPzsdHGHY7QMwK8NyEj/GmLIHdCulCwT6F4UWYbxEV7vZshoE/9ntekijElizAzeQyhPI/RbywUiaa6HNuauVtTrh4zN5R94LJOgnvIOA617w4ICnizlxAElDKWkfwUUXK/g==

**MARIA LUISA BARROSO GARCIA | Fecha:2021-10-12 14:55:56 | Firmante**

tgEG4liiKWEy4dNXeFE+zaVmZ3TY4Pw6jwj9X9K/qccKdu/vX2cF8PS84GI/3TrHg7DRNridGW3fBRvHe5nvLhLKhWTCs0h4Q3zLF9AB/otaJkrhSVf9AqPFz17qFEJWESCSSqxXM8jshlaxQTCFK5JsmEOOsolqAKeErlmaB1JbCqDjpaA4W5av2fFJMa7PdzGhR9vylsUd1LJM8FQWQCQRoS0vEcP74svtNBbCp1Uif2zqVWVmsLIHe7k2CI4JUhaU/zEnS5oV9blP0l/F5TnmJXRSNK3tOYWG7Y7zu5qmGOhe92QxSW9yaesBPuj+cgIWev5RJBByR8tByagBVQ==

**MARIA LUISA CASTREJON GODINEZ | Fecha:2021-10-12 15:52:39 | Firmante**

N66Dy7WL4dQkd6S0MdP5T2uPyssrRPTNacEqKjF7BCIba4yWHAuh4/Dtem4itFr3R8/9pPuxRndhubQvVPUpxmmeE3f6ySHe4+PKTaGtvfKAZP2aLzQjJprv+BFJ7+hiauaNABSqYsK3ee8PZACB0ZHoxkekplsM/PMZbTVqawmj22HHEpm7vT/j5w4ls66BLkukPnMJhEugpsMslC/FPeTf1LqibZAR4K3yZkGW4YJSNk6k94W9MdpOL1+nY3nnRrnXMe1/2ysj8sMYl3yNw6G6/ZRsan1jAJ+FPs690PD0AappJvIK+JFuJulWgUqzCVfQPsGqBGRFWLaLk3Zw==

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2021-10-13 19:06:19 | Firmante**

uN07xpbwvwy1f4HUkyHc1W2CceTeQk+XKCFxpyvoOL5Ewn1DHvX9DIdVcU2sIRIRTGhQVmAQRlMn00UIXDMFGkxpV0cdq+w4Lr48pDhuVa6dQHBLw9JPL6PdVlWuNnVkeTPNrO4cbHZaD3Edrb/OXsRp/9xPOX034UX6ShDiAxOwO7Ego6r3CVHbKAU1hRvtOV5BfZgRj4DLsXRCgU16CWtuPaveopOcbh0dgd1Huuwpg4XKnnZ4cQUhJehriwl+Tuwm1H35D9vfpvifV2LWmbgs26CwAdF4kGzH0sYNIJkptWZgyTRc4kd/ocAgfqmJ4IN4ggDGTvm+hEO5Un9w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



enqtR3vKo

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/tvX7FI8wHNvdtjgKgWffFVBv11HigCfc>

