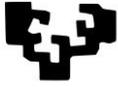
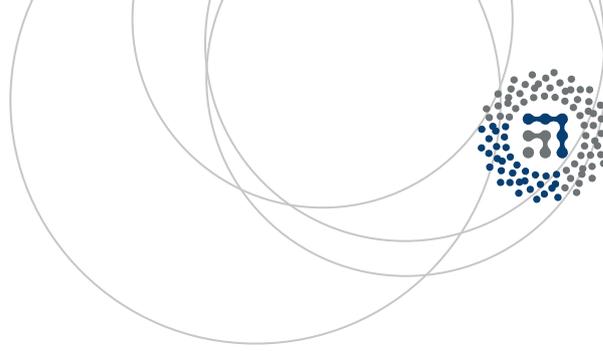


eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

Análisis de proteínas implicadas en autofagia

Estudios biofísicos de complejos lípido-proteína

Autor:

Jorge Ullate Mora

Directora:

Alicia Alonso Izquierdo

Co-directora:

Ane Landajuela Larma

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
METODOLOGÍA	4
Expresión y purificación de proteínas	4
Preparación de liposomas	4
• Vesículas unilamelares grandes (LUVs).....	4
• Vesículas unilamelares gigantes (GUVs).	5
Técnicas de visualización de los cambios en las membranas inducidos por proteínas de autofagia	5
• Seguimiento de la agregación a 400 nm	5
• Mezcla intervesicular de lípidos (ensayo de fusión)	6
• Visualización de la formación de agregados de GUVs por microscopía confocal.....	7
RESULTADOS	7
Purificación de proteínas	7
Agregación de vesículas	7
Mezcla intervesicular de lípidos (ensayo de fusión de vesículas lipídicas).....	9
Agregación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)	9
DISCUSIÓN	10
CONCLUSIONES	12
ANEXO 1: ABREVIATURAS	12
BIBLIOGRAFÍA	14

INTRODUCCIÓN

La autofagia es un proceso mediante el cual fragmentos del citosol o de los orgánulos subcelulares son digeridos por los lisosomas de forma regulada. Se acepta generalmente que las membranas celulares juegan un papel importante en la autofagia, y que la formación ordenada de ciertos complejos lípido-proteína es esencial para su mecanismo. Uno de los fenómenos menos conocidos en la autofagia es el proceso por el cual, a través de múltiples eventos de fusión de vesículas pequeñas, se forma el autofagosoma. El presente trabajo pretende avanzar en el conocimiento de la formación de los procesos implicados en la formación del autofagosoma mediante la utilización de sistemas reconstituidos integrados por sistemas modelo lipídicos y proteínas de autofagia humanas.

Existen varios tipos de autofagia, entre los que se encuentran la microautofagia (cuando los lisosomas incorporan pequeñas porciones de citosol u otros orgánulos), la autofagia mediada por chaperonas, y la macroautofagia. La macroautofagia fue descrita por primera vez en mamíferos, donde se observó que orgánulos completos podían ser secuestrados dentro de vesículas de doble membrana, las cuales se denominaron autofagosomas (1). El autofagosoma se fusiona con los lisosomas, tras lo cual el contenido secuestrado es degradado rápidamente. Así, la macroautofagia es la mayor fuente de nutrientes y precursores biosintéticos cuando el suministro de nutrientes a las células es insuficiente. Además, la autofagia específica puede tener lugar en presencia de nutrientes, para eliminar orgánulos dañados, o para ayudar en la diferenciación celular (por ejemplo, en el proceso de maduración de los eritrocitos), o simplemente para dirigir el recambio de orgánulos (2). Defectos en la mitofagia (la autofagia específica de mitocondrias) han sido relacionados con la enfermedad del Parkinson (3).

Una pregunta sin resolver es cómo se forma y elonga la membrana del autofagosoma (4). La hipótesis más ampliamente aceptada propone la formación *de novo* a partir de una estructura pre-autofagósomica (PAS), a partir de la cual se produce la adhesión y fusión de nuevas membranas (5). La elongación del autofagosoma estaría catalizada por proteínas específicas, e implicaría la interacción de las mismas con los lípidos de la membrana. Se han identificado alrededor de 20 proteínas Atg (autophagy-related) en mamíferos, las cuales son esenciales en las etapas iniciales de la formación del PAS y elongación del autofagosoma. Entre ellas, el sistema Ubl (ubiquitin-like) está relativamente bien caracterizado (Figura 1). Este sistema utiliza la activación en cascada de una serie de proteínas, similar a la cascada de ubiquitinación de proteínas, y conduce a la unión de la proteína Ubl con su diana, que en este caso es lipídica: la fosfatidiletanolamina (PE) o fosfatidilserina (PS) presentes en el PAS (6).

El primer miembro descubierto de la familia Ubl fue Atg8 de *S. cerevisiae*. Se conocen varios homólogos de Atg8 en mamíferos, divididos en las subfamilias LC3 y GABARAP/GATE-16 (7). Estas proteínas son proteolizadas por Atg4B, lo que provoca la exposición de una Gly C-terminal. Tras la proteólisis, GABARAP, LC3 y GATE-16 son activadas (en humanos) por el homólogo humano de Atg4B (hAtg7, ubiquitin E1-like), y transferidas a la Atg3 humana (hAtg3, ubiquitin E2-like), después de lo cual son capaces de conjugarse con PS o PE (8, 9). Esta unión covalente proteína-lípido es esencial para la elongación del autofagosoma, aunque el mecanismo molecular subyacente sigue sin conocerse.

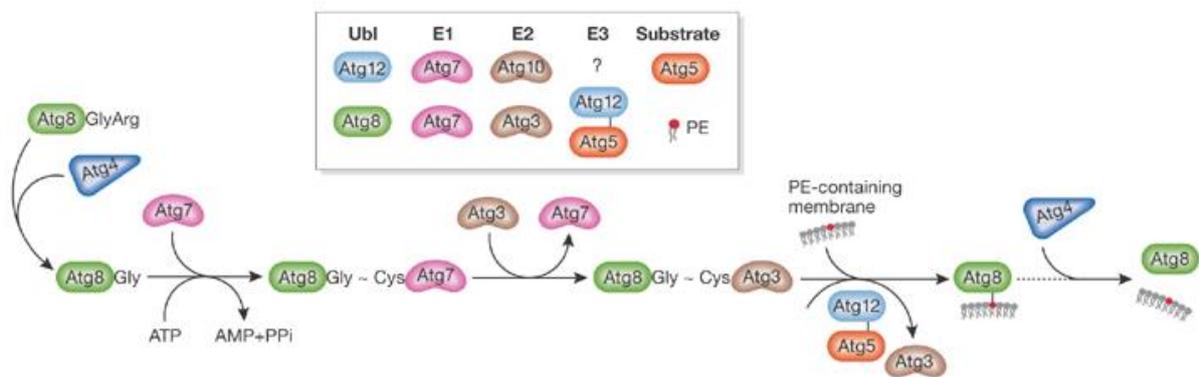


Figura 1. Sistema de conjugación de Atg8 en la autofagia. En lugar de conjugarse a otra proteína, la proteína Atg8 se une a fosfatidiletanolamina (PE). La Arg 117 residuo C-terminal de Atg8 es proteolizado inicialmente por la proteasa de cisteína, Atg4, para exponer la glicina G116. Esta glicina expuesta forma un enlace tioéster con el residuo cisteína 507 de ATG7. Desde Atg7, Atg8 se transfiere a Atg3, también a través de un enlace tioéster. En último lugar, la glicina 116 de Atg8 se conjuga a PE a través de un enlace amida. Conjugada a PE, Atg8-PE existe en una forma fuertemente asociada a la membrana. (Figura obtenida de la referencia 6).

Estudios *in vitro* con las proteínas autofágicas de levadura (10), mostraron que la unión Atg8-PE, en presencia de Atg7, Atg3 y ATP provoca la agregación de liposomas compuestos por DOPE:POPC:biPI (55:30:15). En el mismo estudio se demostraba que el complejo Atg8-PE también induce la hemifusión de los mismos liposomas marcados con Rho-PE y NBD-PE, lo cual sugiere que Atg8 está directamente implicada en la elongación de membranas autofagosómicas en levaduras. El crecimiento podría darse a través de la asociación de varios complejos Atg8-PE situados en diferentes vesículas/membranas, lo cual causaría la deformación de las membranas y su posterior fusión (Figura 2). Sin embargo, queda sin explicar el mecanismo de fusión completa de las vesículas, así como el papel de las diferentes especies lipídicas presentes en las membranas (algunas posiblemente activadoras, otras inhibitoras). Además, la mayoría de la información descrita ha sido obtenida con proteínas de levaduras, mientras que las proteínas de mamíferos son menos conocidas.

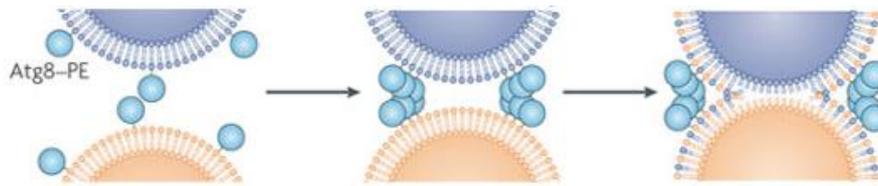


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción del complejo Atg8-PE: induce fusión de vesículas al situarse entre ellas y provocar su acercamiento. (Figura obtenida de la referencia 11).

Por último, es importante destacar que mediante mutagénesis dirigida, podemos modificar la glicina C-terminal de las proteínas por una cisteína. Esta cisteína C-terminal es capaz de unirse al lípido comercial DPPE-MBP, que reacciona con los grupos tiol de las proteínas (Figura 3). Se ha demostrado que el complejo hAtg8-PE obtenido mediante este protocolo es capaz de insertarse en la membrana, y dicho complejo es también capaz de inducir la agregación de vesículas *in vitro*, si bien, los mecanismos subyacentes siguen siendo controvertidos.

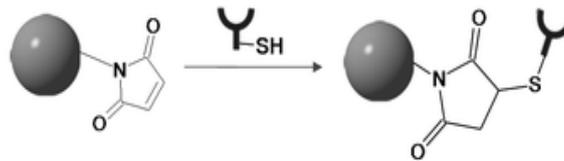


Figura 3. Reacción de adición nucleófila que se produce entre el lípido comercial DPPE-MBP y un grupo tiol, en nuestro caso de un residuo de cisteína. (Figura obtenida de la referencia 12).

OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es avanzar en la comprensión de los mecanismos de acción de las proteínas autofágicas humanas, principalmente, en aquellas implicadas en la formación del autofagosoma.

Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Obtener los mutantes C-terminales de cisteína de las proteínas autofágicas humanas LC3, GATE-16 y GABARAP (LC3 G120C; GATE-16 G116C y GABARAP G116C) ancladas al lípido sintético PE-maleimida.
- Realizar un análisis comparativo de la capacidad de cada una de las proteínas para inducir la fusión de vesículas *in vitro*.

METODOLOGÍA

Expresión y purificación de proteínas

Para la expresión de la proteína utilizamos la cepa bacteriana *E. coli* BL21 (DE3). Después de la transformación celular y la inducción de la sobreexpresión, las proteínas se purificarán etiquetadas con GST. Todos los plásmidos están basados en pGEX-6P-1 que permite la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad con glutathion-sepharose 4B e hidrólisis adicional con la proteasa PreScission Protease (GE Healthcare) para separar las proteínas de la etiqueta GST. El proceso de purificación de las proteínas puede dividirse en sucesivas etapas:

Primeras etapas: El sedimento bacteriano con células *E. coli* en las que se indujo la expresión de las diferentes proteínas autofágicas humanas se resuspendió en tampón de lisis (Tampón Fosfato (PBS), 20mM Tris (pH 7,5)), suplementado con una pastilla de inhibidores de proteasas (PMSF), 1mg/ml de lisozima (Sigma) y 2.5 µg/ml RNAsa (Sigma). Una vez disuelto el sedimento, la mezcla se incubó durante 3 horas a 4°C y fue sometida a 40 ciclos de sonicación (10 segundos encendido; 10 segundos apagado) manteniéndola en hielo en todo momento. A continuación, la muestra se centrifugó a 20.000g durante 20 minutos y se recogió el sobrenadante (que contiene la fracción soluble de las proteínas recombinantes) para continuar con el proceso de purificación.

Cromatografía de afinidad: Para purificar las proteínas, se utilizó una columna con glutatió-n-sefarosa 4B. Por cada litro de cultivo celular, se utilizaron 500 µl de resina previamente lavados con agua destilada y tampón de lisis. El sobrenadante bacteriano se incubó con la resina durante 4 horas a 4°C, tras lo cual se incubó la proteína con la proteasa PreScission Protease durante 4 horas a 4°C. Finalmente, las proteínas se eluyeron con tampón B (50mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM TCEP). Las fracciones procedentes de la columna de afinidad se analizaron por SDS-PAGE.

Preparación de liposomas

En este estudio se han empleado LUVs, liposomas unilamelares grandes (Large Unilamellar Vesicles) y liposomas unilamelares gigantes, GUVs (Giant Unilamellar Vesicles):

- Vesículas unilamelares grandes (LUVs): Su composición lipídica es la siguiente: liposomas blancos (Egg PC (54 %), PS (5 %), PE^{Mal} (15 %), DOPE (20 %), y colesterol (6 %)) y liposomas fluorescentes (Egg PC (50 %), PS (5 %), PE^{Mal} (15 %), DOPE (20 %), y

colesterol (6%) , Rho-PE (2 %), NBD-PE (2 %). En primer lugar los lípidos se mezclaron con la mezcla de cloroformo:metanol (2:1), que se evaporó mediante un flujo de nitrógeno. Posteriormente, los lípidos se llevaron a sequedad dejándolos en vacío dos horas, tras lo cual se rehidrataron con tampón (50 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1mM MgCl₂) en volúmenes crecientes con continua agitación a temperatura ambiente. Los liposomas que se formaron (MLVs) fueron sometidos a 10 ciclos de congelación-descongelación (baño en nitrógeno líquido seguidos de baños a 65°C) para obtener vesículas unilamelares. Por último, estas vesículas unilamelares se sometieron a extrusión con filtros de 0,1 µm, siguiendo el método descrito en Mayer y cols, 1986 (13), obteniendo finalmente LUVs de unos 100 nm de diámetro. El tamaño de los liposomas fue determinado por dispersión de luz cuasielástica (QELS).

- Vesículas unilamelares gigantes (GUVs): Los GUVs, en cambio, se prepararon por el método de electroformación descrito en Angelova y cols, 1992 (14), con la siguiente proporción lipídica: liposomas marcados (Egg PC (24,5 %), PS (35 %), DOPE (20%), PI3P (5 %), PE^{Mal} (15 %), Rho-PE (0,5 %)) y liposomas blancos (misma composición pero sin PE^{Mal}). Así, la preparación de los GUVs a partir de lípidos puros comenzó con la preparación de la mezcla lipídica (1mM) en cloroformo. A continuación, se colocaron 3 µl de la mezcla lipídica, gota a gota, a lo largo de cada alambre de platino de la celda de electroformación y se añadió un volumen de solución de sacarosa (lo suficiente para cubrir los alambres, 400-500 µl) en cada celda. Los GUVs se generaron bajo una corriente alterna de 10 Hz y un voltaje de 2.5V durante 1 hora, seguida de 45 minutos a 2.5 Hz y 2.5V para separar los GUVs del alambre. Este proceso se llevó a cabo en tampón Tris 50 mM (pH 7.5), 150 mM NaCl y 1mM MgCl₂.

Técnicas de visualización de los cambios en las membranas inducidos por proteínas de autofagia

- Seguimiento de la agregación a 400 nm

La agregación es un paso previo a la fusión de vesículas. De esta manera, los liposomas, que inicialmente apenas dispersan luz, pueden originar un aumento de absorbancia a 400 nm, que se puede medir en un espectrofotómetro. Esta técnica se ha utilizado para el estudio de la fusión de membranas inducida por las proteínas autofágicas.

Para realizar los ensayos se depositó la suspensión de 0,2 mM LUV en una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico y se dejó equilibrar unos minutos a 37°C con agitación continua. Posteriormente se añadieron las proteínas y se registró el aumento de turbidez a 400 nm en un Uvikon 922 (Kontron).

- Mezcla intervesicular de lípidos (ensayo de fusión)

Para estudiar la fusión se eligió el método de mezcla de lípidos, usando para ello lípidos marcados fluorescentemente con NBD-PE y Rho-PE (15). Estos fluoróforos son estructuras lipídicas que se incorporan fácilmente en la membrana, de tal manera que las vesículas contienen ambas sondas. La transferencia de energía tiene lugar debido al solapamiento de los espectros de excitación y emisión de ambos fluoróforos: el NBD se excita a 465 nm, y cede su energía de emisión (530 nm) a la rodamina (λ excitación a 560 nm), la cual desplaza la emisión del sistema a 585 nm (Figura 4). Por lo tanto, cuando los dos fluoróforos están cerca no vemos emisión de fluorescencia de NBD ya que la energía fluorescente se transfiere a la rodamina. Al ocurrir la fusión entre vesículas marcadas y no marcadas, los fluoróforos se diluyen y se separan uno del otro, es entonces cuando se registra un aumento de fluorescencia de NBD. Para realizar este tipo de experimentos se prepararon LUVs marcados con 2% molar (en lípido) de NBD-PE y 2% molar (en lípido) de Rho-PE.

Los liposomas marcados se mezclaron con liposomas no marcados en una relación 1:4 (marcados: no marcados, proporción molar). El 100% de fluorescencia (100% de mezcla de lípidos) se consiguió con la misma cantidad de liposomas añadiendo 1 mM TritonX-100.

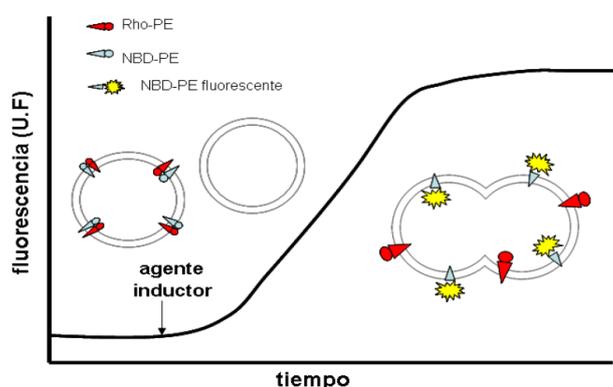


Figura 4. Esquema ilustrativo de la técnica empleada para medir la fusión de vesículas. Ver detalles en el texto.

- Visualización de la formación de agregados de GUVs por microscopía confocal

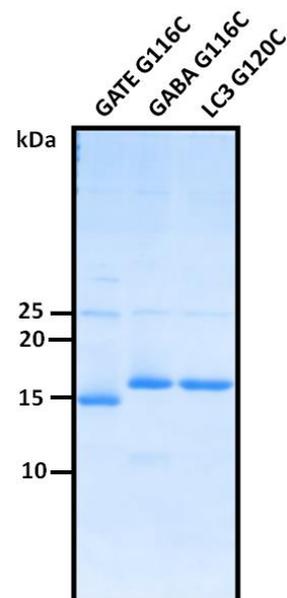
Los GUVs fueron preparados por el método de electroformación (ver sección 2 del apartado de metodología). Para los experimentos de agregación, 80µl de GUVs se añadieron a un soporte especial para su visualización en un microscopio confocal. Antes de añadir los GUVs, el soporte se bloqueó con BSA (10 mg/ml) y se añadieron 320µl de tampón 150mM NaCl, 50mM Hepes (pH 7,5), 1mM MgCl₂ y las proteínas autofágicas humanas a una concentración de 10µM. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se visualizaron en un microscopio invertido de fluorescencia Nikon D-ECLIPSE C1. Para procesar las imágenes se utilizó el programa ImageJ.

RESULTADOS

Purificación de proteínas

El primero de los objetivos de nuestro trabajo era la obtención de las tres proteínas homólogas implicadas en la elongación del autofagosoma, una tarea sin la cual no se podría llevar a cabo el resto de los objetivos. Tras purificarlas, siguiendo el protocolo explicado en el apartado de metodología, se cargaron 0,5 µg de cada fracción correspondiente a cada una de las proteínas y se analizaron por SDS-PAGE, haciéndose visibles por tinción con Azul de Coomassie (Figura 5).

Figura 5. SDS-PAGE de las tres proteínas autofágicas humanas utilizadas en este trabajo. El peso molecular se muestra en kDa en la izquierda.



Agregación de vesículas

A continuación, evaluamos la capacidad de cada una de las tres proteínas purificadas para inducir la agregación de vesículas lipídicas *in vitro*. En primer lugar, la cinética del proceso de agregación se estudió por turbidometría, midiendo la dispersión de luz a 400 nm. Las tres proteínas (Figura 6) inducen agregación de LUVs *in vitro* siendo GABARAP la más potente, seguida por GATE-16 y finalmente LC3.

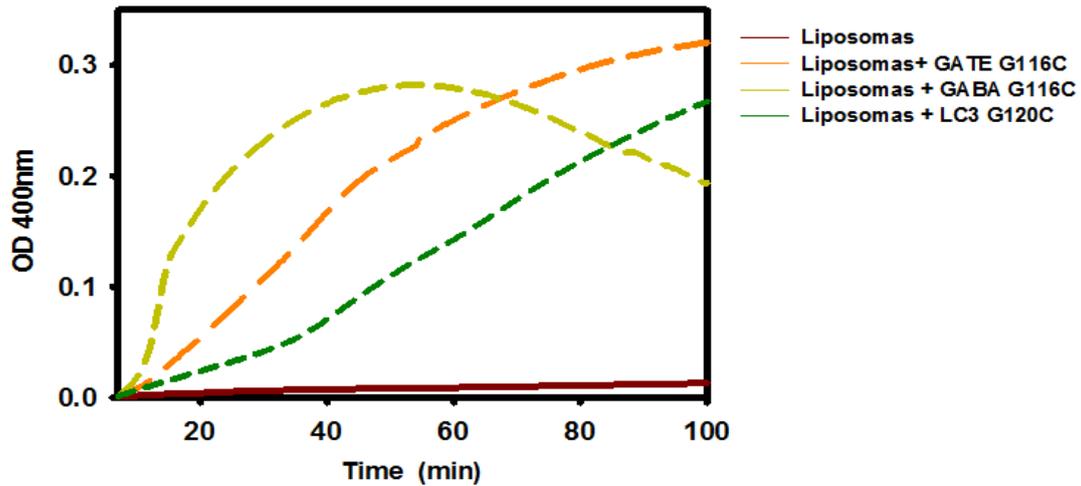


Figura 6. Agregación de vesículas lipídicas (LUVs) por proteínas autofágicas humanas. Medidas de OD a 400 nm de liposomas con cada una de las tres proteínas (GATE G116C, GABARAP G116C y LC3 G120C) y de liposomas solos en función del tiempo. Este parámetro es directamente proporcional a la agregación de liposomas, ya que cuando estos agregan se produce un aumento de la turbidez, registrable a 400 nm. Así, según este ensayo GABA (amarillo) es la que más agregación induce, seguida de GATE (naranja) y LC3 (verde).

Destaca, no obstante, que la agregación mediada por cada una de las tres proteínas no sigue la misma dinámica, dado que como puede apreciarse claramente en la Figura 6 las pendientes son sustancialmente distintas, lo que refleja que en estas condiciones, al menos, el comportamiento agregante de GABARAP se encuentra favorecido frente al de las otras dos proteínas en momentos iniciales. De hecho, según aumenta el tiempo del ensayo la pendiente también varía, no se trata únicamente de la notable diferencia en la pendiente inicial, sino de la variación de ésta a lo largo del tiempo.

Así, puede observarse que en el caso de GABARAP G116C la pendiente comienza a disminuir hasta que la turbidez alcanza un máximo, a partir del cual la turbidez comienza a disminuir, lo que indica que la agregación está disminuyendo. Este descenso, no obstante, es atribuible a que el tamaño de los agregados ha llegado a un punto en el que son más grandes que la longitud de onda utilizada, de forma que no se cumple la condición de Rayleigh y, en consecuencia, las mediciones se ven alteradas. Con respecto a GATE G116C y a LC3 G120C, puede apreciarse que sus medidas de turbidez siguen una dinámica muy similar a la de GABARAP G116C: la pendiente de la medida de OD a 400 nm va disminuyendo con el tiempo de la misma manera que en el caso de GABARAP, con la única diferencia de que aún no han alcanzado el máximo.

Mezcla intervesicular de lípidos (ensayo de fusión de vesículas lipídicas)

La agregación es un paso previo a la fusión de vesículas lipídicas. Sin embargo, el hecho de que haya agregación no garantiza que también haya fusión, por lo que para determinar si ésta se produce, debemos realizar ensayos orientados específicamente a detectarla.

Para analizar este aspecto, y tal y como se explica en el apartado de metodología, utilizamos un método espectrofluorimétrico basado en la transferencia de energía entre los fluoróforos NBD y rodamina para evaluar la capacidad de cada una de las proteínas para inducir la mezcla intervesicular de lípidos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7, donde se puede observar que las tres proteínas analizadas inducen un aumento en la fluorescencia del NBD (medida a 535 nm), indicativo de mezcla intervesicular de lípidos *in vitro*.

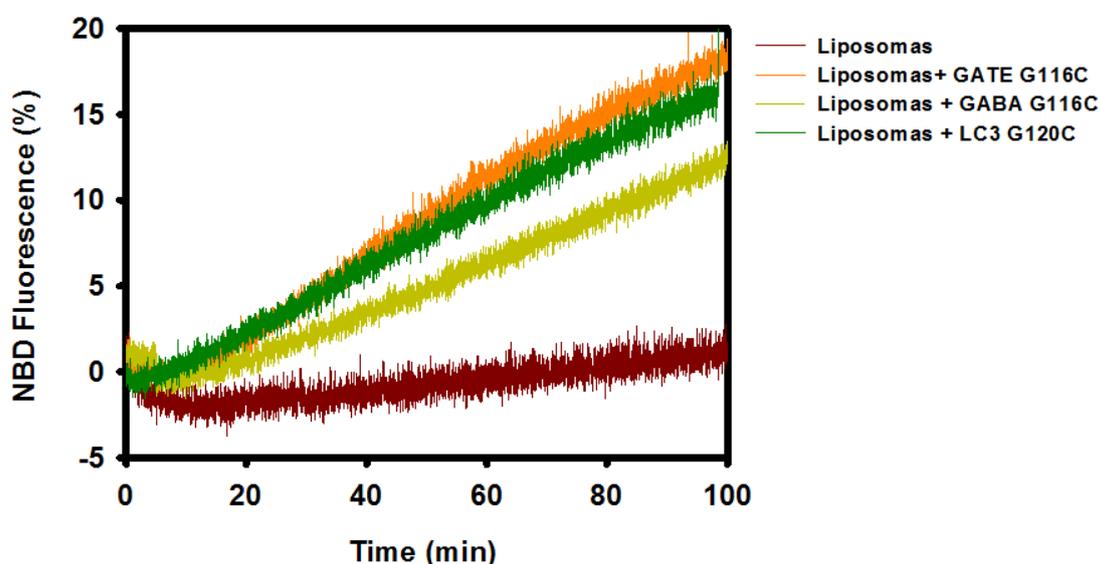


Figura 7. Mezcla intervesicular de lípidos por proteínas autofágicas humanas. Aumento de la fluorescencia de NBD (excitación: 467nm, emisión: 535nm) en ausencia (rojo) o en presencia de las proteínas autofágicas indicadas.

Es de resaltar que, en este ensayo, el comportamiento de GATE y LC3 es más similar entre sí que lo que indicaban con respecto a la agregación, lo que parece apuntar a un comportamiento distinto entre ellas dos en cuanto a su potencial como agentes fusogénicos.

Agregación de Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs)

Tras analizar la capacidad de las proteínas para inducir la agregación y la mezcla intervesicular de lípidos en LUVs, el siguiente paso fue evaluar su capacidad para inducir la agregación de GUVs. Los GUVs, a diferencia de los LUVs, poseen un tamaño (1-100µM) que permite su

visualización directa por microscopía, pudiendo aportar información muy valiosa sobre las estructuras que se forman durante los procesos de agregación.

Tal y como se muestra en la Figura 8, en ausencia de proteínas los GUVs, con forma esférica, se distribuyen de manera homogénea por todo el campo de visualización. Tras una hora de incubación con las proteínas indicadas, los GUVs aparecen agregados, fuertemente unidos, apareciendo planas las zonas de contacto (fotografías superior e inferior derechas).

Todos estos resultados indican que las proteínas mutantes conjugadas al lípido PE^{Mal} inducen, por ellas mismas, la agregación *in vitro* de vesículas lipídicas de diferente tamaño.

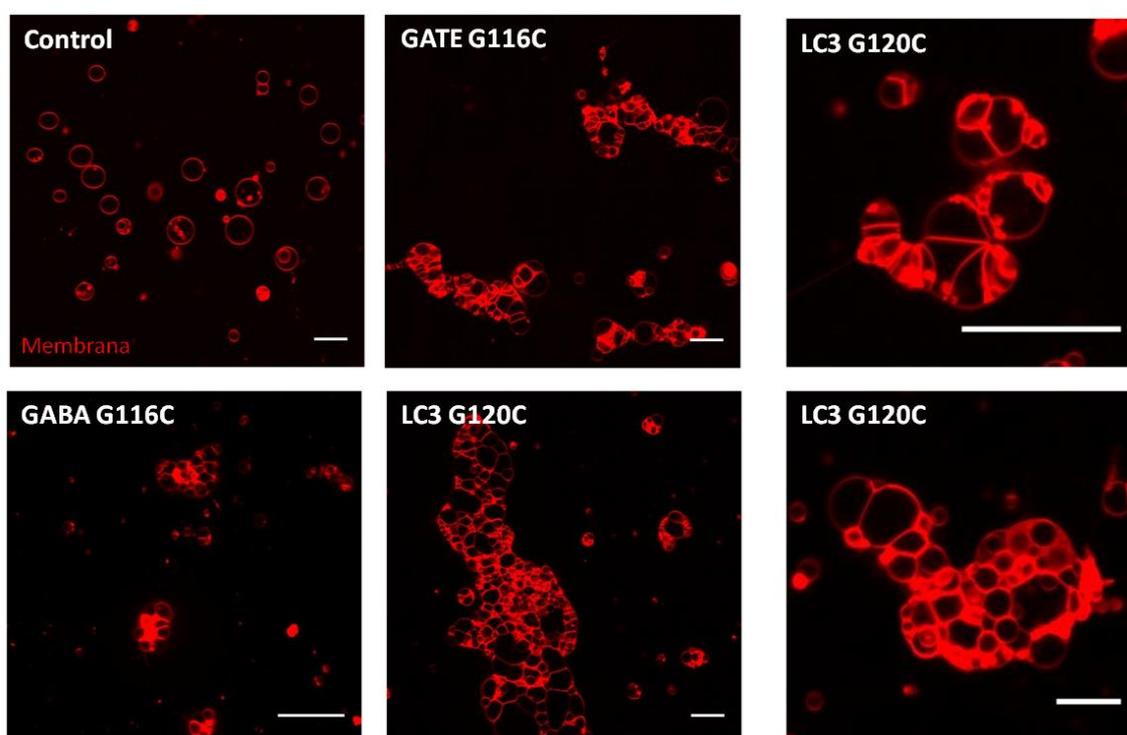


Figura 8. Agregación de GUVs por proteínas autofágicas humanas. Imágenes representativas de GUVs en ausencia (control) o presencia de las proteínas indicadas. Las proteínas fueron incubadas con los liposomas a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. En las dos fotografías de la columna de la derecha se observa en detalle los agregados de GUVs, en donde las vesículas, que pierden su esfericidad, aparecen fuertemente unidas unas a otras. Escala de la barra 20µm.

DISCUSIÓN

Pese a que está bien establecido que LC3 y sus homólogos GATE/GABARAP juegan un papel esencial durante el proceso autofágico, el mecanismo molecular subyacente está lejos de estar bien caracterizado. Además, un gran número de artículos señalan que la familia de proteínas

SNARE (16, 17), implicadas en el tráfico vesicular intracelular, son imprescindibles en la formación del autofagosoma.

Los resultados de este trabajo indican que LC3 y sus homólogas, una vez conjugadas al lípido PE^{MAL}, inducen por ellas mismas, la agregación y la mezcla intervesicular de lípidos *in vitro*. No podemos olvidar que, sin embargo, *in vivo*, la función de estas proteínas puede estar regulada por muchos otros factores, tanto proteicos como lipídicos, así como por la curvatura de las membranas donde actúan las diferentes proteínas (18). En este sentido, nuestro siguiente objetivo es analizar el impacto de la curvatura (diferente tamaño) y la composición lipídica de las vesículas sobre la función de las proteínas.

Es importante destacar que los experimentos de fusión aquí mostrados corresponden a valores globales de mezcla de lípidos, no pudiendo diferenciar entre fusión completa y hemifusión. Para poder diferenciar entre ambos mecanismos, debemos llevar a cabo otro enfoque experimental basado en la eliminación selectiva de la fluorescencia de la hemicapa externa de los liposomas, o basados en la mezcla intervesicular del contenido acuoso de las mismas, lo que demostraría efectivamente la fusión completa de las vesículas. De la misma manera, deberíamos introducir muchos más controles en nuestros experimentos, como el uso de agentes bloqueantes del grupo tiol de nuestras proteínas que demuestren que el efecto observado es efectivamente causado por la proteína unida al grupo maleimida del fosfolípido PE.

Por otra parte, experimentos de silenciamiento génico de las diferentes homólogas de LC3 indican que si bien las tres proteínas son esenciales en la formación del autofagosoma (19), cada una de ellas parece jugar un papel diferente durante distintas etapas del proceso. Así, mientras LC3 estaría implicada en el crecimiento y elongación del autofagosoma, GATE y GABARAP lo estarían en el cierre del mismo. Si bien nuestros resultados no demuestran diferencias claras en cuanto al mecanismo de acción de las tres proteínas, nos proponemos marcar las proteínas fluorescentemente y visualizar por microscopía confocal su localización en las membranas de los GUVs durante el proceso de agregación. Estos experimentos podrían revelar preferencias puntuales de cada una de las proteínas para localizarse en regiones concretas del agregado, sugiriendo, por ejemplo, preferencias de curvatura por cada una de las proteínas.

Diferentes modelos (20) defienden que estas proteínas oligomerizan en la membrana y que la oligomerización entre proteínas situadas en diferentes vesículas produce el acercamiento de

estas últimas provocando su agregación y su fusión completa. Para comprobar este mecanismo nos proponemos analizar la capacidad de cada una de las proteínas aquí estudiadas para oligomerizar *in vitro*, utilizando para ello diferentes agentes entrecruzantes, ampliamente usados en este tipo de experimentos.

Por último, un estudio (21) señala que el extremo N-terminal juega un papel crucial en los procesos de fusión vesicular llevados a cabo por estas proteínas. Para analizar esta región con más detalle, llevaremos a cabo mutaciones puntuales en esta región y analizaremos la capacidad de las proteínas mutantes para agregar y fusionar vesículas lipídicas *in vitro*.

Dada la complejidad inherente al proceso autofágico, las aproximaciones *in vitro*, basadas en proteínas recombinantes purificadas y sistemas modelo de membrana pueden aportar luz sobre el mecanismo molecular de acción de esta fascinante familia de proteínas.

CONCLUSIONES

- Hemos conseguido obtener de manera recombinante, modificadas en su último residuo C-terminal, las versiones completas de las proteínas autofágicas humanas LC3, GATE y GABARAP.
- Las proteínas mutantes se unen al grupo maleimida del lípido modificado PE^{MAL}.
- Las proteínas unidas al lípido PE^{MAL} inducen, por sí solas, la agregación y la mezcla intervesicular de lípidos.
- Hemos sido capaces de reconstituir en GUVs el proceso de agregación por parte de estas proteínas y la visualización de grandes agregados vesiculares por microscopía confocal.

ANEXO 1: ABREVIATURAS

Atg: autophagy-related gene (Gen relacionado con la autofagia)	(Gen número de referencia)
Atg3: Autophagy-related protein 3	bIPI: bovine liver phosphatidylinositol
Atg4: Autophagy-related protein 4	(Fosfatidilinositol de hígado bovino)
Atg7: Autophagy-related protein 7	BSA: Bovine serum albumin (Seroalbúmina humana)
Atg8: Autophagy-related protein 8	

DOPE: dioleoylphosphatidylethanolamine
(Dioleilfosfatidiletanolamina)

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
(ácido etilendiaminotetraacético)

Egg PC: Egg phosphatidylcholine
(fosfatidilcolina de huevo)

GABARAP: GABA(A) receptor-associated
protein (Proteína asociada al receptor del
ácido gamma-aminobutírico)GATE-16:
GABA(A) receptor-associated protein-like 2
(protein 2 asociada al receptor del ácido
gamma-aminobutírico)

GST: glutathione S-transferase (glutatión S-
transferasa)

GUVs: Giant Unilamellar Vesicles
(Liposomas unilamelares gigantes)

HEPES: 4-(2-Hydroxyethyl) piperazine -1-
ethanesulfonic acid, (Ácido 4,2
hidroximetilpiperazine 1 etalnolsulfónico)

LC3: Microtubule-associated protein 1 light
chain (cadena ligera de la protein 1
asociada a microtúbulos)

LUVs: Large Unilamellar Vesicles
(Liposomas unilamelares grandes)

MLVs: Multilamellar Vesicles (Liposomas
multilamelares)

NBD: *N*-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)

PAS: Pre-Autophagosomal Structure
(Estructura del preautofagosoma)

PE: Phosphatidylethanolamine
(Fosfatidiletanolamina)

PI3P: Phosphatidylinositol 3-phosphate
(Fostatidilisitol 3-fosfato)

POPC: Palmitoyloleoyl
phosphatidylcholine.(Palmitoleilfosfatidilco
lina)

PS: phosphatidylserine(Fosfatidilserina⁹)

Rho: Rhodamine (Rodamina)

RNAase: Ribonuclease (Ribonucleasa)

SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate
polyacrylamide gel electrophoresis
(electrophoresis en gel de poliacrilamida
con dodecil sulfato sódico)

SNARE: Soluble NSF Attachment Protein
Receptor. (Receptor del conjunto de
proteínas de fusión solubles, sensibles a la
N-etilmaleimida)

TCEP: Tris (2-carboxyethyl) phosphine
hydrochloride (Hidrocloruro de TRIS2-
carboxietilfosfina)

BIBLIOGRAFÍA

1. Lamb, C. A., Yoshimori, T., y Tooze, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Mol. Cell Biol.* 14, 759-774 (2013).
2. Vetin, V. M., Singleton, B. K., Parsons, S. F., Anstee, D. J., Lane, J.D. Autophagy facilitates organelle clearance during differentiation of human erythroblasts: evidence for a role for ATG4 paralogs during autophagosome maturation. *Autophagy.* 9(6), 881-893 (2013).
3. Redmann, M., Dodson, M., Boyer-Guittaut, M., Darley-USmar, V., Zhang, J. Mitophagy mechanisms and role in human diseases. *Int. j Biochem Cell Biol.* 53, 127-133 (2014).
4. Klionsky, D. J. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J. Cell Sci.* 118, 7-18 (2005).
5. Suzuki, K., Ohsumi, Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett.* 584(7), 1280-1286 (2010).
6. Geng, J., Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.* 9(9), 859-864 (2008).
7. Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol.* 12, 226-237 (2011).
8. Metlagel, Z., Otomo, C., Ohashi, K., Takaesu, G., Otomo, T. Structural insights into E2-E3 Interaction for LC3 lipidation. *Autophagy.* 10(3), 522-533 (2014).
9. Nakatogawa, H., Oh-oka, K., Ohsumi, Y. Lipidation of Atg8: how is substrate specificity determined without a canonical E3 enzyme? *Autophagy.* 4(7), 911-913 (2008).
10. Ichimura, Y., Imamura, Y., Emoto, K., Umeda, M., Noda, T., Ohsumi, Y. In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* 279(39), 40584-40592 (2004).
11. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. y Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10(7), 458-467 (2009).
12. Shoichet, M. S., Shi, M. y Lu, J. Organic nanoscale drug carriers coupled with ligands for targeted drug delivery in cancer. *J. Mater. Chem.* 19, 5485-5498 (2009).
13. Mayer, LD., Hope, MJ. y Cullis, PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. *Biochim Biophys Acta.* 858, 161-168 (1986).

14. Angelova, MI., Soleau, S., Meleard, P., Faucon, JF. y Bothorel, F. Preparation of giant vesicles by external AC electric fields. Kinetics and applications. *Progr Colloid Polymer Sci.* 89, 127-131 (1992).
15. Struck, DK., Hoekstra, D. y Pagano, RE. Use of resonance energy transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry.* 20, 4093–4099 (1981).
16. Klionsky, D. J., Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., Baba, M., McNew, J. A., Jiang, X., Reggiori, F. y Melia, T. J. SNARE proteins are required for macroautophagy. *Cell.* 146, 290-302 (2011).
17. Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C. y Rubinsztein, D. C. Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion. *Cell.* 146, 303-317 (2011).
18. Melia, T. J., Nath, S. et al. Lipidation of the LC3/GABARAP family of autophagy proteins relies on a membrane-curvature-sensing domain in Atg3. *Nat. Cell Biol.* 16(5), 415-424 (2014).
19. Elzar, Z., Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F. y Shinder, V. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO Jour.* 29, 1792-1802 (2010).
20. Ohsumi, Y., Ichimura, Y. y Nakatogawa, H. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell.* 130, 165-178 (2007).
21. Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F. y Elazar, Z. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Dev. Cell.* 20(4), 444-454 (2011).