

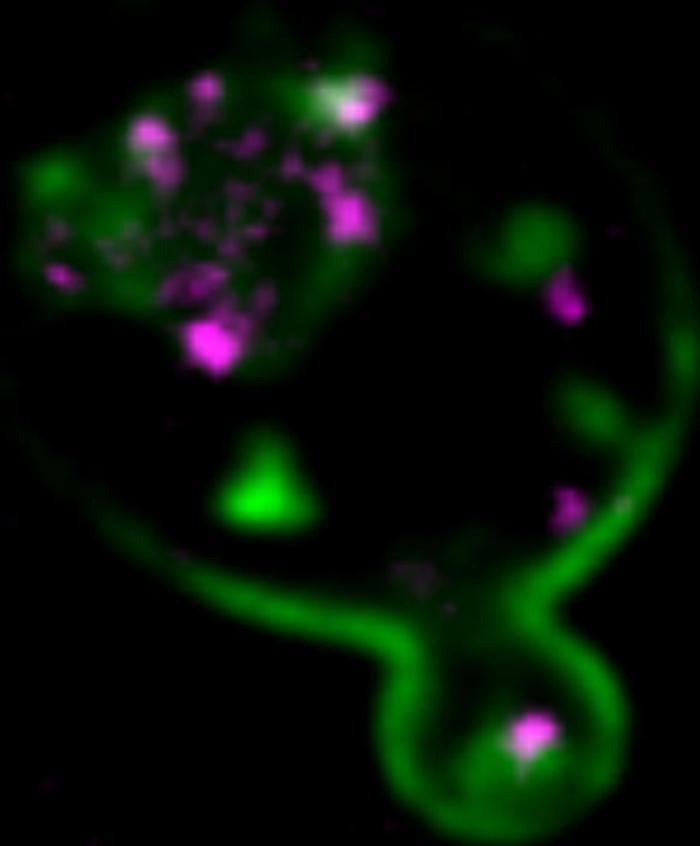


# ROL DE LA GEOMETRÍA DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA EN LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA TIPO II

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Químicas por

**Lic. GONZALO BIGLIANI**

**Director: Dr. JAVIER VALDEZ TAUBAS**



*Nada se aprende tan bien como lo que es descubierto.*

*Sócrates*

# **ROL DE LA GEOMETRÍA DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA EN LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA TIPO II**

---

Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias  
Químicas por

**Lic. GONZALO BIGLIANI**

Director de Tesis: Dr. JAVIER VALDEZ TAUBAS

**Centro de Investigación en Química Biológica de Córdoba  
(CIQUIBIC-CONICET)**

**Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto**

**Facultad de Ciencias Químicas**

**Universidad Nacional de Córdoba**

**Director de Tesis:**

Dr. Javier Valdez Taubas

**Comisión asesora de Tesis:**

Dra. María Carolina Touz

Dra. Cecilia Inés Álvarez

Dr. Ernesto Ambroggio

**Evaluador Externo:**

Dr. Pablo S. Aguilar

---

**Fotografía de portada tomada de “Transmembrane-domain shape is a novel endocytosis and polarity signal for single-spanning membrane proteins in yeast” González Montoro, Bigliani and Valdez Taubas JCS 2017**

GFP-Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) (verde) fue transformada en levaduras *WT* que expresan de forma estable el marcador de endosomas tardíos Vps8-3xCherry (magenta) y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia.

---

Mi más sincero agradecimiento,

A las instituciones que aportaron, con espacio, educación pública y financiamiento, lo necesario para la realización de mi tesis doctoral; es decir a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, al CIQUIBIC, a la Agencia Nacional de Producción Científica y Tecnológica y al CONICET.

A mi director de tesis, el Dr. Javier Valdez, por darme un lugar en su laboratorio desde muy temprano, en días como estudiante de Biología Celular. Agradezco su tutoría para seguir creciendo, pero también el haberme dejado aprender y emprender a mi manera, con paciencia. Gracias por tu confianza en mí y por contagiarme tu gran interés por la ciencia.

A los miembros de mi comisión asesora de tesis, la Dra. Carolina Touz, la Dra. Cecilia Álvarez, la Dra. Ana María Cabanillas, a quien recordamos con cariño, y el Dr. Ernesto Ambroggio, por acompañarme durante estos años mostrando siempre interés y confianza en mis resultados. Valoro mucho su buena predisposición y sus aportes tanto durante el desarrollo de mi tesis, así como durante el proceso de escritura. También agradezco al evaluador externo, el Dr. Pablo Aguilar, quien amablemente aceptó la tarea de leer y evaluar esta tesis.

Al Dr. Hugo Maccioni, una fuente de inspiración constante de vocación científica con quien tuve la suerte de compartir discusiones y charlas nutritivas. Al Dr. José Luis "Pepe" Daniotti, a quien siempre recordaré con mucho cariño y admiración. Gracias Pepe por ser para mí un ejemplo de dedicación a la ciencia y a la educación, por tus enseñanzas y por tu calidez.

Infinitamente a mis compañeras y compañeros de laboratorio presentes y pasados con quienes disfruté mucho todos estos años. Consu, gracias por tu compañerismo desde años de cursado en la Facultad, por estar siempre al frente de la batalla para ayudarme y de mi lado en los momentos complicados. Gracias Luz por impregnar el laboratorio con tu amistad enérgica y por hacer cada día más divertido. A las y los que ya no están; gracias Aye por enseñarme con vehemencia durante mis primeros pasos, por tu apoyo y amistad, y por seguir estando presente cada vez que necesito orientación. Sabri, gracias tu amistad llena de bondad, por tus enseñanzas, por reírte siempre de mis chistes y por las mejores tortas de cumpleaños. Gracias Quio por haber aportado tu frescura al laboratorio. A todas y todos ustedes gracias por hacer de este el mejor lugar de trabajo. Soy muy afortunado al poder decir que trabajé al lado de grandes amigos.

---

A la Dra. Betty Caputto y a su grupo (con suplentes incluidos) por brindarme su amistad y compañerismo todos estos años. Para mí fue como tener un segundo grupo y aprecio mucho el lugar que me dieron. Gracias Anita, Cele y Lu por los mates y risas compartidas y por estar siempre dispuestas a ayudar. Gracias Cesar por tu amistad, por escucharme y aconsejarme.

A los amigos y amigas que hice en el CIQUI. Que la tesis me haya encontrado con ustedes es suficiente recompensa y hace que esta etapa esté llena de recuerdos felices, especialmente Javi y May gracias por las charlas, mates, cervezas y fiestas.

A todos los miembros del CIQUIBIC, compañeros y compañeras becarias, profes, personal no docente, Piti, Dani, Ceci y Carlos. Gracias por estar siempre dispuestos a ayudar haciendo del CIQUI una familia disfuncional y un excelente grupo de trabajo.

A mis amigos y amigas de Capilla, de la facu y de la vida, por su compañía, la alegría y los momentos compartidos durante estos años, que son impagables. Que hayan estado a mi lado fue lo necesario para transitar este camino.

A mi familia, porque son un pilar fundamental en mi vida y un ejemplo de trabajo y sacrificio. Gracias a mis padres y mi hermana por apoyar siempre mis decisiones y acompañarme. Gracias por enseñarme a valorar la educación y por la confianza que tienen en mí. Haber llegado hasta aquí no hubiera sido posible sin ninguno de ustedes. Los amo.

---

# Rol de la geometría del dominio transmembrana en la endocitosis de proteínas transmembrana tipo II

## Lista de Contenidos

Lista de abreviaturas utilizadas	- 9 -
Lista de Figuras	- 10 -
Lista de Tablas	- 12 -
<b>RESUMEN</b>	- 13 -
<b>ABSTRACT</b>	- 15 -
<b>INTRODUCCIÓN</b>	- 17 -
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo</b>	- 18 -
<b>Nomenclatura De Genes, Proteínas Y Cepas De <i>S. cerevisiae</i></b>	- 21 -
<b>Proteínas Transmembrana</b>	- 22 -
<b>Introducción al transporte vesicular de lípidos y proteínas</b>	- 24 -
<b>Vía Biosintética/Exocítica</b>	- 25 -
Transporte entre el Retículo Endoplásmico y el Golgi	- 25 -
Transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática	- 26 -
Transporte de proteínas de membrana hacia la vacuola	- 26 -
<b>Endocitosis y la Vía de Reciclado</b>	- 27 -
La vía del reciclado	- 28 -
Endocitosis y polaridad en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 29 -
Regulación de la endocitosis	- 30 -
Señales de endocitosis	- 31 -
<b>Dominios de membrana</b>	- 33 -
Dominios en membranas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 34 -
<b>ANTECEDENTES Y PLANTEO DE OBJETIVOS</b>	- 35 -
<b>RESULTADOS</b>	- 37 -
<b>CAPÍTULO I: LA GEOMETRÍA DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA ES UNA NOVEDOSA SEÑAL DE ENDOCITOSIS</b>	- 38 -
<b>I.A UN DOMINIO TRANSMEMBRANA LARGO CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA ES UNA SEÑAL DE ENDOCITOSIS Y POLARIDAD EN <i>S. cerevisiae</i></b>	- 38 -
Una versión mutante de Sso1 con un hemi dominio transmembrana exoplásmico voluminoso se localiza de forma polarizada en <i>S. cerevisiae</i>	- 40 -
La distribución polarizada de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) se mantiene mediante endocitosis y reciclado a la membrana plasmática	- 41 -

---

La endocitosis de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) se debe al volumen del hemi dominio transmembrana y no a la secuencia de aminoácidos	- 43 -
El dominio transmembrana de Sso1 no es una señal de retención en la membrana plasmática	- 44 -
El volumen del hemi-dominio transmembrana y no su hidrofobicidad es un determinante de endocitosis	- 46 -
<b>I.B DOMINIOS TRANSMEMBRANA ENDÓGENOS CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA PUEDEN ACTUAR COMO SEÑAL DE ENDOCITOSIS Y POLARIDAD EN <i>S. cerevisiae</i></b>	- 48 -
El dominio transmembrana de Hkr1 funciona como señal de endocitosis	- 49 -
El dominio transmembrana de Kre6 puede determinar endocitosis	- 50 -
<b>I.C UN DOMINIO TRANSMEMBRANA LARGO CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA FUNCIONA COMO SEÑAL DE ENDOCITOSIS EN CÉLULAS CHO-K1</b>	- 54 -
Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) se localiza en compartimentos endosomales en células CHO-K1	- 54 -
Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) es activamente internalizada en células CHO-K1	- 56 -
<b>I.D DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b>	- 58 -
<b>CAPÍTULO II: ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ENDOCITOSIS MEDIADA POR DOMINIOS TRANSMEMBRANA</b>	- 61 -
<b>II.A RSP5 AFECTA DE FORMA INDIRECTA LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS TRANSMEMBRANA LARGOS Y VOLUMINOSOS EN SU MITAD EXOPLÁSMICA</b>	- 61 -
La polarización de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) no se ve afectada en mutantes de endocitosis temprana	- 61 -
Búsqueda de posibles receptores endocíticos para Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )	- 62 -
Rsp5 afecta la endocitosis de quimeras con un hemi-TMD largo y voluminoso	- 64 -
El efecto de Rsp5 sobre la polaridad de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) es indirecto	- 66 -
<b>II.B EL VOLUMEN DEL HEMI-DOMINIO TRANSMEMBRANA EXOPLÁSMICO PUEDE DIRIGIR LA PARTICIÓN A DIFERENTES DOMINIOS DE MEMBRANA <i>in vivo</i></b>	- 70 -
El dominio citoplásmico de Pep12 puede relocalizar TMDs largos a la membrana vacuolar	- 71 -
Pep12(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> ) se segrega a un dominio diferente al de Pep12(Sso1)	- 72 -
Pep12(Sft1 <sub>8</sub> -Sso1 <sub>8</sub> ) y Pep12(Sso1 <sub>8</sub> -Sft1 <sub>8</sub> ) particionan al mismo microdominio	- 73 -
<b>II.C DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS</b>	- 76 -
<b>CONCLUSIÓN</b>	- 79 -
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	- 83 -
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	- 91 -

---

APÉNDICE 1: Tabla de aminoácidos con sus respectivos volúmenes y valores de hidrofobicidad utilizados para los cálculos realizados en este trabajo de tesis. - 101 -

APÉNDICE 2: Lista de proteínas transmembrana con un solo paso transmembrana residentes de membrana plasmática de *S. cerevisiae* utilizadas para análisis bioinformático. - 102 -

**Lista de abreviaturas utilizadas**

COP	Complejo Proteico de Cubierta
EMC	Endocitosis Mediada por Clatrina
EIC	Endocitosis Independiente de Clatrina
TMD	Dominio Transmembrana
GFP	Proteína Fluorescente Verde
GPMV	Vesícula Gigante de Membrana Plasmática
HA	Hemaglutinina del virus de la influenza humana
<i>Lo</i>	líquido ordenado
<i>Ld</i>	líquido desordenado
MCC	Compartimento ocupado por Can1
MP	Membrana Plasmática
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RE	Retículo Endoplásmico
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	SNAP receptor
TGN	Red de Trans Golgi
<i>WT</i>	Salvaje o silvestre

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Ciclo sexual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Figura 2.** Esquema de los métodos de modificación del genoma y de clonado por recombinación homóloga.
- Figura 3.** Esquema de clasificación de proteínas integrales de membrana según su topología.
- Figura 4.** Representación de las distintas vías de transporte vesicular en levadura.
- Figura 5.** Esquema del proceso de internalización endocítica.
- Figura 6.** Representación del fenotipo de distribución polarizada en *S. cerevisiae*.
- Figura 7.** Representación esquemática de dominios transmembrana y su localización subcelular.
- Figura 8.** Un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es un determinante de polaridad en *S. cerevisiae*.
- Figura 9.** La distribución polarizada de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se mantiene mediante endocitosis y reciclado.
- Figura 10.** Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) colocaliza con el marcador de la red de *trans* Golgi Sec7.
- Figura 11.** Localización subcelular y tráfico de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr.
- Figura 12.** Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>) no se encuentra polarizada en la membrana plasmática.
- Figura 13.** Correlación entre el volumen y la hidrofobicidad de los aminoácidos.
- Figura 14.** El volumen y no la hidrofobicidad del hemi-TMD exoplásmico es un determinante endocitosis.
- Figura 15.** Análisis bioinformático de la geometría del dominio transmembrana de proteínas tipo I y II de *S. cerevisiae*.
- Figura 16.** El TMD de Hkr1 se comporta como una señal de endocitosis y determinante de polaridad.
- Figura 17.** HA-Kre6 se encuentra polarizada mediante endocitosis y reciclado.
- Figura 18.** Localización intracelular de Sso1(Kre6).
- Figura 19.** El TMD de Kre6 puede determinar endocitosis y polaridad en la membrana plasmática.
- Figura 20.** Localización subcelular de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en células CHO-K1.
- Figura 21.** Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) colocaliza con Transferrina-Alexa Fluor 647.
- Figura 22.** Un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es endocitado en células CHO-K1.
- Figura 23.** Esquema de localización y transporte de proteínas transmembrana tipo II con un hemi-TMD largo y voluminoso.
- Figura 24.** Esquema de localización y transporte de la proteína quimérica GFP-Sso1(Kre6).
- Figura 25.** La endocitosis de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no es afectada por proteínas de endocitosis temprana.
- Figura 26.** La endocitosis de hemi-TMDs largos y voluminosos es afectada por Rsp5.
- Figura 27.** Rsp5 afecta la polaridad de hemi-TMDs largos y voluminosos endógenos de *S. cerevisiae*.
- Figura 28.** El efecto de Rsp5 sobre la polaridad de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es indirecto.
- Figura 29.** La familia de adaptadores  $\alpha$ -Arrestinas no afecta la polaridad de hemi-TMDs largos y voluminosos.

**Figura 30.** Estrategia experimental para evaluar la influencia de la geometría del TMD en la partición a dominios de membrana *in vivo*.

**Figura 31.** El dominio citoplásmico de Pep12 re-localiza a los TMD de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) a la membrana vacuolar.

**Figura 32.** Pep12(Sso1) y Pep12(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) particionan a dominios diferentes en la membrana vacuolar.

**Figura 33.** Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) son degradadas en la vacuola.

**Figura 34.** Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) particionan al mismo dominio en la membrana vacuolar.

**Figura 35.** Modelo Hipotético 1.

**Figura 36.** Modelo Hipotético 2.

## Lista de Tablas

**Tabla 1.** Volumen e hidrofobicidad promedio de los hemi-dominios transmembrana exoplásmicos de Sso1, Mid2<sub>11</sub> y Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>.

**Tabla 2.** Análisis de posibles receptores endocíticos de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>).

**Tabla 3.** Análisis de posibles adaptadores de Rsp5 para Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>).

**Tabla 4.** Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.

**Tabla 5.** Anticuerpos primarios y secundario utilizados en inmunofluorescencia.

# RESUMEN

---

La endocitosis es un proceso crucial para todas las células ya que les permite incorporar material desde el espacio extracelular y controlar la disponibilidad de proteínas transmembrana en la membrana plasmática (MP). Después de ser internalizadas por endocitosis las proteínas *cargo* se transportan a los endosomas y luego a los lisosomas/vacuolas donde son degradadas o pueden ser recicladas de nuevo a la MP siguiendo la vía de transporte retrógrado desde los endosomas al aparato de Golgi, donde son incorporadas nuevamente a la vía secretora. En la levadura, la endocitosis seguida de reciclado a la MP resulta en una distribución polarizada de las proteínas, que se concentran en la membrana de la célula hija. De acuerdo al modelo canónico, la selección de proteínas transmembrana para ser internalizadas por endocitosis mediada por vesículas cubiertas de clatrina involucra la presencia de señales en los dominios citoplásmicos de las proteínas *cargo*. Estas señales son reconocidas por distintos receptores o adaptadores que forman parte de la cubierta proteica y es mediante esta interacción que las proteínas *cargo* transmembrana son concentradas en los sitios de la MP donde inicia la endocitosis.

En este trabajo de tesis hemos estudiado la influencia de la geometría del dominio transmembrana (TMD) en la endocitosis de proteínas con solo un paso transmembrana. Utilizando TMDs quiméricos mostramos que la geometría del TMD actúa como un determinante de transporte a nivel de la MP. Particularmente, demostramos que un TMD largo con una mitad exoplásmica conformada por aminoácidos voluminosos resulta en una señal de polaridad y endocitosis en *Saccharomyces cerevisiae*. Una búsqueda bioinformática en el proteoma de este organismo modelo identificó varias proteínas con un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso, lo que nos permitió validar nuestros resultados utilizando TMDs endógenos de levadura. Por otro lado, también demostramos que un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es funcional como señal de endocitosis en células de mamífero en cultivo.

Además, realizamos diferentes análisis para comprender cómo proteínas con un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso resultan endocitadas. Encontramos que la internalización de las mismas es afectada de forma indirecta por la ubiquitin ligasa Rsp5. Por otro lado, mostramos que la geometría de los TMDs determina la partición de los mismos a diferentes dominios lipídicos *in vivo*.

La identificación de este novedoso determinante de endocitosis dado por la geometría del TMD muestra una nueva forma mediante la cual las proteínas *cargo* pueden ser reconocidas e incluidas en la vía endocítica. Esta forma se basa en un principio fundamental diferente de las señales endocíticas previamente conocidas y, por lo tanto, agrega nuevas perspectivas sobre el mecanismo de endocitosis.

# ABSTRACT

---

Endocytosis is a crucial process for all cells because it allows them to incorporate material from the extracellular space and control the availability of transmembrane proteins in the plasma membrane (PM). After being internalized from the PM, cargo proteins can be transported to endosomes where they are sorted between those targeted for lysosomal/vacuolar degradation and those redirected to the Golgi to be readdressed to the PM by entering the secretory pathway. In yeast, endocytosis followed by recycling to PM results in a polarized distribution of the proteins that accumulate at the membrane of the daughter cell. According to the canonical model, the selection of transmembrane proteins to be internalized by endocytosis mediated by clathrin-coated vesicles involves the presence of signals in the cytoplasmic domains of the cargo proteins. These signals are recognized by different receptors or adapters that are part of the protein coat and it is through this interaction that transmembrane cargos are concentrated in endocytic sites.

In this thesis, we have studied the influence of transmembrane domain (TMD) geometry in the endocytosis of proteins with only one TMD and we demonstrate that TMD shape can act as a transport determinant at the PM. Particularly, a long TMD with an exoplasmic half constituted of bulky amino acids results in a polarity and endocytosis signal in *Saccharomyces cerevisiae*. A bioinformatics search in the proteome of this model organism identified several proteins with a high volume exoplasmic hemi-TMD which allowed us to validate our results using endogenous TMDs from yeast. We also demonstrate that a bulky exoplasmic hemi-TMD is functional as a signal of endocytosis in mammalian cells.

As part of this work, we also analyzed how proteins with a long and high volume exoplasmic hemi-TMD are endocytosed. We show that their internalization is indirectly affected by the ubiquitin ligase Rsp5. On the other hand, we determine that the geometry of the TMDs can dictate their partition into differential lipid domains *in vivo*

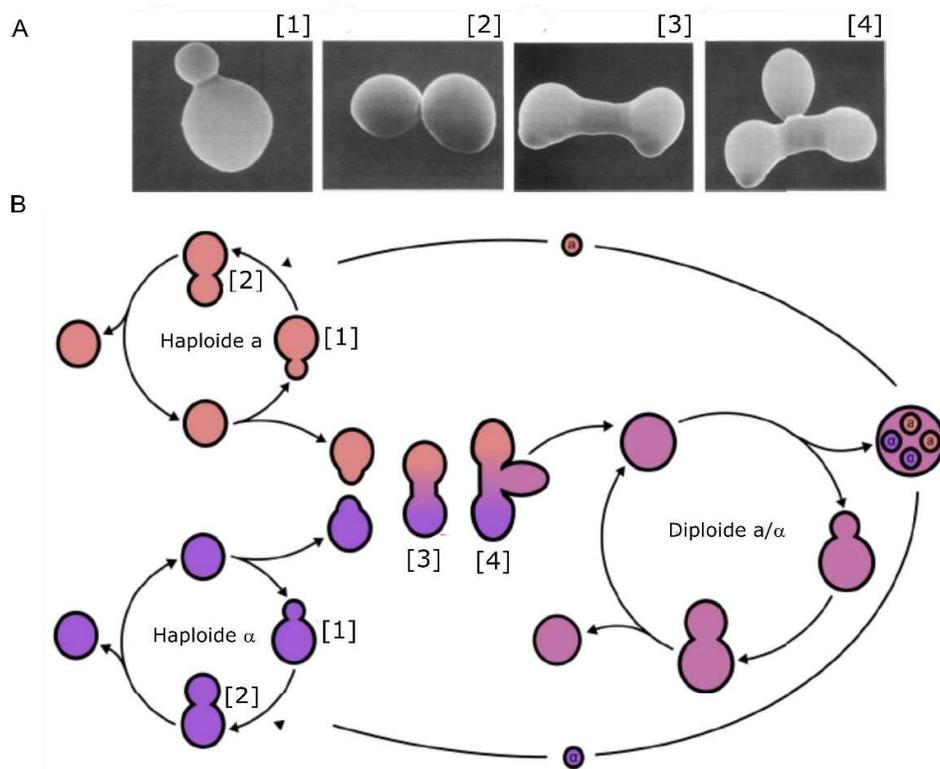
The identification of this novel endocytosis determinant given by the geometry of TMD shows a new way by which cargo proteins can be recognized and included in the endocytic pathway. It is based on a fundamental principle different from the previously known endocytic signals and, therefore, adds new perspectives on the mechanism of endocytosis.

# INTRODUCCIÓN

---

## *Saccharomyces cerevisiae* como organismo modelo

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un sistema modelo reconocido que consiste en una célula eucariota simple cuyo genoma puede ser fácilmente manipulado. Esta levadura pertenece al *Phylum Ascomycota* y en la naturaleza se encuentra principalmente en frutas maduras. Sus células tienen forma ovalada con diámetros entre 5 y 10  $\mu\text{m}$  (Figura 1A, paneles 1 y 2). Ha sido utilizada por la humanidad desde tiempos ancestrales en la fabricación de pan, vino y cerveza, y es un organismo eucariota muy utilizado en investigación básica, debido a que presenta numerosas ventajas. Entre ellas se encuentran el corto tiempo de duplicación (1.25-2hs a 30°C), las condiciones de crecimiento sencillas y de bajo costo, y el hecho de que puede ser transformada con ADN foráneo con facilidad.



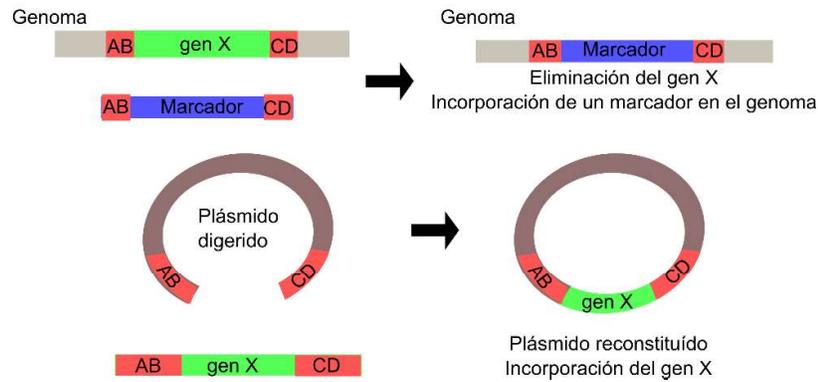
**Figura 1. Ciclo sexual de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.** A. Imágenes de microscopía tomadas de Herskowitz, 1988 (1) donde se muestran células haploides con una célula hija pequeña [1] o mediana [2], de un cigoto [3] y de un cigoto del cual está germinando una célula diploide [4]. B. Esquema del ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae*, muestra que las levaduras pueden ser haploides o diploides según el estado del ciclo. Ambos tipos celulares son estables y pueden reproducirse de forma sexual. Se muestra también el proceso de apareamiento de las células haploides, que genera un cigoto y posteriormente células diploides. En condiciones de estrés nutricional, las células diploides pueden generar esporas, que al germinar generan células haploides.

Las células de *S. cerevisiae*, a diferencia de la mayoría de los microorganismos, pueden encontrarse en un estado haploide o diploide, y son viables bajo el control distintos tipos de marcadores que se aplican como presión de selección (generalmente auxotrofías y resistencia a antibióticos). Tanto las células haploides como las diploides son capaces de permanecer estables en ese estado, y ambas se

duplican por un proceso de mitosis asimétrica, en el cual una célula hija de menor tamaño crece de un lado de la célula madre, conocido como gemación. Las células haploides pueden ser de dos tipos sexuales: el tipo **a** y el tipo **α**. Cada uno de estos tipos sexuales es capaz de producir una feromona, el factor **a** y el factor **α** respectivamente, que es secretada al medio. Al detectar en el medio la feromona del tipo sexual contrario, las células haploides detienen su ciclo celular, y generan protrusiones en la dirección del gradiente de feromona. Al entrar en contacto, las células de distinto tipo sexual se fusionan, generando un cigoto diploide **a/α**, que puede dividirse por gemación, generando nuevas células diploides (Figura 1B) (1).

El genoma de *S. cerevisiae* fue el primer genoma eucariota en ser secuenciado (2). Desde entonces, se han realizado revisiones periódicas en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae* ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)), que es una plataforma con gran cantidad de información y referencias cruzadas. Su genoma está organizado en un set haploide de 16 cromosomas y consta de aproximadamente 12 Megabases que codifican para alrededor de 6000 genes. En contraste con el genoma de organismos multicelulares, el genoma de la levadura es altamente compacto ya que los genes representan el 72% del total, con secuencias intergénicas cortas. Además, solamente el 4% de los genes de *S. cerevisiae* contienen intrones (3,4).

*S. cerevisiae* puede ser transformada con ADN foráneo con una altísima eficiencia, permitiendo la obtención de grandes cantidades de transformantes. Los extremos libres de ADN son poco tolerados y sufren recombinación homóloga con una eficiencia muy alta. Esta característica del organismo es extremadamente útil, ya que permite modificar su genoma fácilmente y realizar clonado de fragmentos por recombinación homóloga. Para realizar modificaciones genómicas, se transforma la levadura con un fragmento de ADN lineal (producto de PCR o plásmido linealizado) que contiene la secuencia que queremos introducir en el genoma, flanqueada por secuencias idénticas a las secuencias entre las cuales queremos introducirla. La levadura recombinará estos fragmentos, quedando inserta de esa manera la secuencia de interés en el genoma, y si esta secuencia contiene un marcador de selección, las células que la hayan incorporado pueden ser aisladas fácilmente (Figura 2, panel superior). Esta técnica sirve para eliminar genes completos, interrumpir genes, reemplazar un alelo por otro o agregar epítopes en ambos extremos de un determinado gen, y ha sido utilizada en este trabajo de tesis para el marcado de proteínas endógenas con proteínas fluorescentes y para la eliminación de genes de interés (Capítulo IV). El clonado por recombinación, se basa en el mismo principio, se co-transforman en la levadura un plásmido digerido y el fragmento de ADN lineal que se quiere insertar en el plásmido. Si los extremos de ambos fragmentos son idénticos, la levadura los recombinará, insertando el fragmento en el plásmido (Figura 2, panel inferior). Esta técnica ha sido utilizada en este trabajo de tesis para la generación de versiones quiméricas de distintas proteínas transmembrana a partir de fragmentos de ADN sintéticos (Capítulos I, II y III).



**Figura 2. Esquema de los métodos de modificación de secuencias del genoma y de clonado por recombinación homóloga.** En *S. cerevisiae* los extremos libres de ADN son poco tolerados y altamente recombinogénicos. La transformación de levaduras con un fragmento de ADN flanqueado por secuencias homólogas a secuencias genómicas permite la introducción de secuencias en el genoma o bien el reemplazo de una secuencia de ADN por otra, que puede ser seleccionada si contiene un marcador de selección, permitiendo la delección de fragmentos genómicos (panel superior). La co-transformación de dos fragmentos de ADN con segmentos finales homólogos permite la fusión de los mismos por recombinación homóloga (panel inferior).

Además de poder modificar el genoma de *S. cerevisiae*, también se puede introducir información genética en plásmidos. Los mismos pueden ser incorporados por la levadura como moléculas replicativas (plásmidos circulares de alto o bajo número de copias) o mediante incorporación de los mismos al genoma por recombinación homóloga (plásmidos integrativos). A su vez, estos plásmidos pueden tener una gran variedad de promotores, constitutivamente activos o inducibles/reprimibles para regular la expresión génica. También llevan un marcador de selección que complementa las auxotrofías celulares (mutación en genes que codifican enzimas que metabolizan aminoácidos o bases, tales como LEU2, HIS3, TRP1, LYS2, URA3 o ADE2) y permite su mantenimiento en las células después de la transformación, que se realiza mediante un protocolo sencillo, de bajo costo y muy eficiente.

Finalmente, *S. cerevisiae* resulta un modelo simple pero que comparte la compleja organización intracelular de los eucariotas superiores; así lo ilustran numerosas contribuciones fundamentales en el estudio de procesos como señalización celular, metabolismo de lípidos, transporte intracelular, entre otros. La vía secretora de transporte vesicular fue la primera vía de tráfico claramente entendida, principalmente gracias al trabajo realizado en levadura en el laboratorio del Dr. Randy Schekman en los años ochenta. Subsecuentemente, los estudios en *S. cerevisiae* permitieron la identificación de la mayoría de los efectores, complejos de proteínas y rutas de tráfico en células eucariotas, y la mayoría de ellos se encuentran conservados en eucariotas superiores (5).

## **Nomenclatura De Genes, Proteínas Y Cepas De *S. cerevisiae***

Los genes de *S. cerevisiae* poseen un nombre estándar y un nombre sistemático. El nombre estándar está conformado por tres letras y un número (por ejemplo: VPS1, SEC9, etc.), a excepción de algunos genes que ya habían sido nombrados previo a la disposición de esta regla. Las tres letras provienen de una frase que brinda información sobre la función del gen, un fenotipo de la mutación del mismo o el proceso en el cual está involucrado, por ejemplo, VPS1 proviene de Vacuolar Protein Sorting 1. El nombre sistemático es el nombre generado en el proyecto de secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* y se refiere al cromosoma y la posición en la cual se encuentra el marco abierto de lectura.

La nomenclatura utilizada en este trabajo para las cepas, genes y proteínas de *S. cerevisiae* es la siguiente:

Los genes se nombran completamente en mayúscula (por ejemplo: LEU2, HIS3, URA3, etc.).

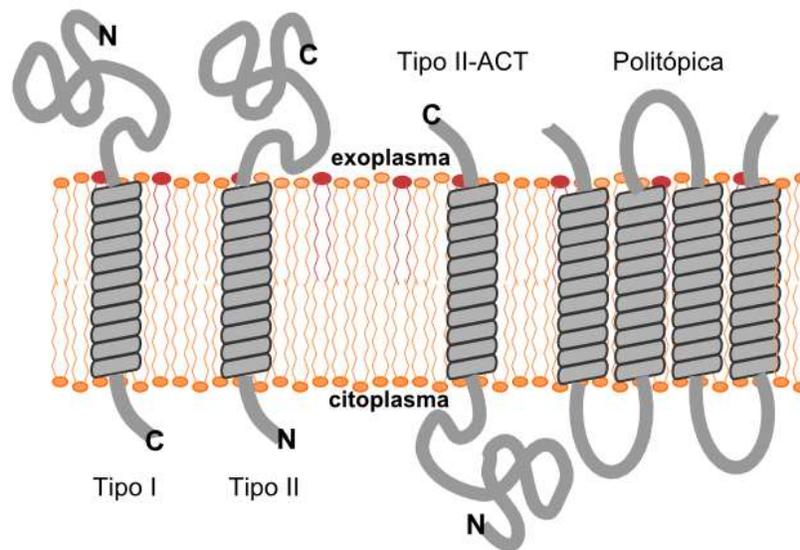
Las proteínas correspondientes se nombran solo con la primera letra en mayúscula (por ejemplo: Leu2, His3, Ura3, etc.).

Las cepas de delección de un determinado gen se nombran con el nombre de dicho gen completamente en minúscula y en itálica, seguido de la letra griega delta mayúscula (por ejemplo: *leu2Δ*, *his3Δ*, *ura3Δ*, etc.).

## Proteínas Transmembrana

Las proteínas transmembrana, poseen un dominio constituido por aminoácidos hidrofóbicos que les permite insertarse en bicapas lipídicas de manera simultánea o posterior a su síntesis. El 20-30% de las proteínas codificadas en los genomas eucariotas son proteínas integrales de membrana (6). Estas proteínas pueden clasificarse en proteínas politópicas, si tienen múltiples pasos transmembrana, o proteínas de un solo dominio transmembrana (TMD), que a su vez se clasifican en tipo I y tipo II según su topología una vez insertadas en la bicapa lipídica (ver Figura 3).

La inserción a membrana se realiza en el retículo endoplásmico (RE), mayormente de manera co-traduccional. El dominio transmembrana es reconocido por el complejo SRP (7,8) y luego la inserción del polipéptido naciente a la membrana del RE es mediada por el complejo proteico conocido como translocón (9,10). Ha sido descrito que las proteínas ancladas por el C-terminal (ACT, también llamadas TA por el inglés *tail-anchored*, ver Figura 3), es decir proteínas tipo II con su TMD situado en el extremo C-terminal, se insertan en el RE de manera post-traduccional, mediante el complejo proteico GET (11).



**Figura 3. Esquema de clasificación de proteínas integrales de membrana según su topología.**

Las proteínas tipo I poseen su extremo N-terminal en el exoplasma, o lumen, mientras que las tipo II poseen su extremo N-terminal en el citoplasma celular. Las proteínas tipo II-ACT se insertan en la membrana del Retículo endoplásmico de manera post-traduccional.

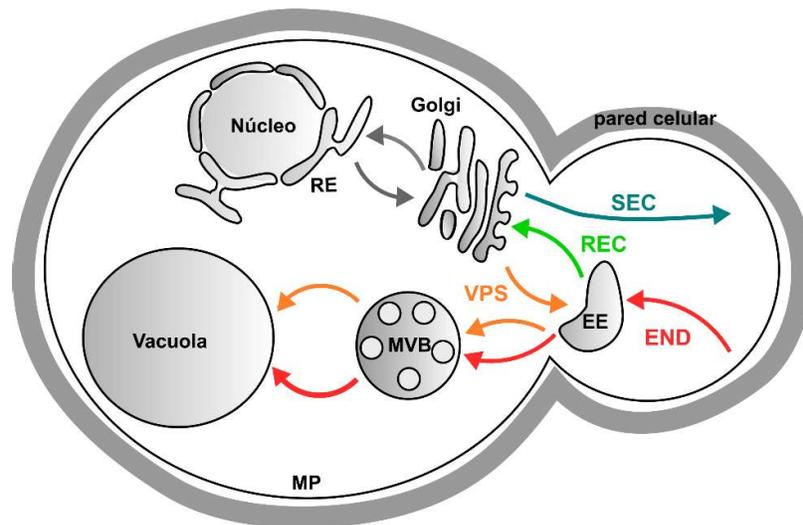
Para poder cumplir sus funciones, es necesario que las proteínas transmembrana sean transportadas al compartimento intracelular correcto, y que existan mecanismos que aseguren su localización estable en su organela de residencia. La localización intracelular y por lo tanto el tráfico de proteínas transmembrana a lo largo de las diferentes vías de transporte, en general, depende de información contenida en los tallos citosólicos de las mismas. Esta información varía según el caso, y puede estar codificada dentro de pequeños motivos aminoacídicos lineales o motivos estructurales, que

median la incorporación selectiva de estas proteínas en algún tipo particular de vesículas de transporte (12). Por otro lado, también existen numerosos estudios que asignan importancia en la determinación de la localización subcelular a ciertas características del dominio transmembrana, en particular su largo (13–18). A continuación, se presentará una breve revisión de los mecanismos moleculares que median el transporte vesicular intracelular en levadura, con especial énfasis en el transporte de proteínas transmembrana tipo II, ya que la localización subcelular de las mismas en la vía endocítica será el principal tema de estudio de esta tesis.

## Introducción al transporte vesicular de lípidos y proteínas

En las células eucariotas, las distintas funciones metabólicas se encuentran compartimentalizadas en organelas intracelulares. Cada compartimento de este sistema de endomembranas posee una composición bioquímica característica, requerida para un óptimo desarrollo de sus funciones. Estas organelas no son estáticas, sino altamente dinámicas ya que intercambian material constantemente, mediante un continuo flujo de lípidos y proteínas que ingresan y egresan de las mismas. Este transporte es llevado a cabo principalmente mediante vesículas que emergen de un compartimento donador, son transportadas hasta la organela blanco, y por último incorporadas a la misma mediante la fusión de ambas membranas (19).

En el sistema de tráfico vesicular, la vía exocítica (biosintética/secretora) es responsable de la biosíntesis y de la entrega de proteínas al compartimento intracelular correcto donde las mismas cumplen una función específica, son modificadas químicamente o degradadas. Por otro lado, el sistema endocítico permite la absorción de nutrientes, el reciclado de lípidos y proteínas de membrana plasmática y la regulación de la composición de la misma, incluyendo la disponibilidad de receptores. Los compartimentos celulares de *S. cerevisiae* y las distintas vías de tráfico que los conectan se encuentran esquematizados de manera simplificada en la Figura 4.



**Figura 4. Representación de las distintas vías de transporte vesicular en levadura.** En el retículo endoplásmico (RE) se sintetizan proteínas solubles y de membrana que son transportadas al aparato de Golgi. En el Golgi, estas proteínas pueden ser incorporadas en vesículas de transporte retrógrado, para las proteínas residentes del RE, en vesículas secretoras (SEC), para proteínas de membrana plasmática (MP) y proteínas extracelulares, o en vesículas cargadas con proteínas destinadas a la vacuola (VPS). La vía endocítica (END) se utiliza para la internalización de proteínas de MP y componentes del medio extracelular. En endosomas tempranos (EE), las proteínas son clasificadas y pueden seguir la vía degradativa hacia la vacuola, después de la maduración de los EE en el endosomas tardíos o cuerpo multivesicular (MVB), o bien seguir la ruta de reciclado (REC) para evitar la degradación y ser redirigidas al Golgi.

## Vía Biosintética/Exocítica

### Transporte entre el Retículo Endoplásmico y el Golgi

La ruta biosintética es una vía compleja y altamente regulada de la cual depende la correcta localización de las proteínas recién sintetizadas. El primer paso de esta vía consiste en el transporte de las proteínas sintetizadas *de novo* desde el RE hacia el aparato de Golgi mediante vesículas con cubierta de complejo proteico COPII. La formación de las vesículas y selección del cargamento de las mismas es un proceso bien estudiado que involucra sitios específicos del RE conocidos como ERES (ER Exit Sites, o sitios de salida del RE) (12). En estas vesículas, el cargamento de proteínas es reclutado de forma directa por interacción de las mismas con la cubierta o indirecta mediante proteínas intermediarias llamadas receptores. La interacción con estos receptores de cargamento ocurre de maneras variadas, pero el receptor que parece incorporar un gran número de proteínas transmembrana en estas vesículas es el receptor Erv14, que interacciona con proteínas que poseen dominios transmembrana largos (13). La incorporación de otras proteínas transmembrana tipo II depende del receptor de membrana Erv26. Por otra parte, muchas proteínas transmembrana pueden interactuar directamente con diferentes componentes del complejo COPII mediante motivos aminoácidos lineales y cortos (SLIMs) presentes en sus tallos citosólicos, como lo hacen los receptores de cargamento (20–23).

Las vesículas con cubierta COPI (también llamada coatómero) median el transporte retrógrado desde el Golgi hacia el RE para componentes esenciales de la maquinaria de transporte y para proteínas residentes del RE (24). Hay pocos motivos descritos que permitirían a las proteínas integrales de membrana interactuar con subunidades del coatómero. Una señal di-lisina cercana al extremo C-terminal de proteínas tipo I permitiría su incorporación a vesículas COPI, resultando en una localización estable en el RE (25). Adicionalmente motivos basados en argininas RxR también serían capaces de mediar interacción con COPI (26); sin embargo, no está muy claro si existirían restricciones sobre la localización de estos motivos con respecto a su distancia al dominio transmembrana de los tallos citosólicos, y si serían exclusivos de proteínas politópicas (27). Además, en levadura se ha descrito otro motivo que permitiría interactuar con COPI de manera indirecta, a través de la interacción con Vps74. Este motivo se halla presente en 16 glicosiltransferasas de *S. cerevisiae* y al ser mutado, resulta en la pérdida de localización en el Golgi (28).

Estas vesículas también median el transporte intra-Golgi, de acuerdo con el modelo de transporte vesicular. Sin embargo, persiste la controversia acerca de cómo ocurre el tránsito de proteínas a través del Golgi. De hecho, hasta la década pasada, se consideraba al aparato de Golgi como una organela estática, conformada por las cisternas *cis*-, *medial*- y *trans*-Golgi, con vesículas cubiertas de COPI mediando el transporte a través de las mismas. Luego, nuevos estudios *in vivo* y mayormente basados en microscopía de superresolución en células de levadura, han propuesto el modelo alternativo de maduración cisternal para el transporte intra-Golgi (29), siendo este ahora el modelo más aceptado al menos para este organismo.

Una vez en el TGN, algunas proteínas *cargo* pueden ser incluidas en vesículas destinadas a fusionarse con la membrana plasmática, mientras otras son incorporadas en vesículas que funden o con endosomas (vía VPS) o directamente con la vacuola (vía AP-3) (Figura 4). Las proteínas residentes del complejo de Golgi serán retenidas en este compartimento gracias a la presencia de diferentes tipos de señales. Estas señales pueden estar dadas en secuencias lineales de aminoácidos presentes en los tallos citoplásmicos (30) o, como se ha mostrado en nuestro laboratorio, por la geometría del dominio transmembrana (17).

## Transporte desde el Golgi hacia la membrana plasmática

Las proteínas *cargo* con destino a la MP son concentradas en vesículas que se escinden del TGN y siguen la vía secretora (SEC) (Figura 4). Estas vesículas son transportadas hacia sitios polarizados de crecimiento de la célula hija mediante filamentos de actina que llegan a la MP. Estudios sugieren la existencia de dos vías de secreción diferentes, ya que las vesículas secretoras se pueden separar en dos poblaciones mediante ensayos de ultracentrifugación. Estas dos poblaciones tienen diferentes composiciones de proteínas y, además, estudios genéticos muestran que un tipo de vesículas va directamente del TGN a la MP, mientras que el otro transita a través de un compartimento endosomal intermedio (31). En células de mamíferos existen dos vías descritas para el transporte desde el TGN a la MP, la vía apical y la vía basolateral, que operan de manera diferenciada incluso en células no polarizadas (32). La mayoría de las proteínas transmembrana son transportadas a la membrana mediante la vía apical, en vesículas con la particular característica de no poseer cubierta proteica. Estas vesículas han sido recientemente llamadas CARTS (CARriers of the TGN to the cell Surface) (33). El transporte a la membrana basolateral es mediado por vesículas con cubierta de clatrina.

Adicionalmente, basado en el enriquecimiento en CARTS de lípidos de fase líquido-ordenada como colesterol y esfingolípidos (34), se sugirió que la formación o existencia de microdominios de fase líquido-ordenada en la membrana del Golgi podría de alguna manera estar involucrada en la formación de estas vesículas, así como en el reclutamiento de cargamento a las mismas (35).

## Transporte de proteínas de membrana hacia la vacuola

Aquellas proteínas que no siguen la vía secretora hacia la MP pueden ser transportadas a la vacuola. Este transporte, se puede dar ya sea a través de endosomas (vía VPS, del inglés *Vacuolar Protein Sorting*) o de forma directa siguiendo la vía de adaptador AP-3 o ALP (del inglés *Alkaline Phosphatase*).

La mayoría de las proteínas de la membrana vacuolar siguen la vía VPS. En el aparato de Golgi, estas proteínas son seleccionadas ya que interactúan con diferentes efectores, como el complejo AP-1 (36). Estos adaptadores concentran a las proteínas *cargo* y aseguran su reclutamiento en las vesículas cubiertas por clatrina en el TGN (37). Estas vesículas luego funden con membranas endosomales mediante contacto con el complejo CORVET (del inglés *Core class C vacuole/endosome tethering*). Finalmente, las proteínas de membrana y los *cargos* solubles alcanzan su localización vacuolar por la

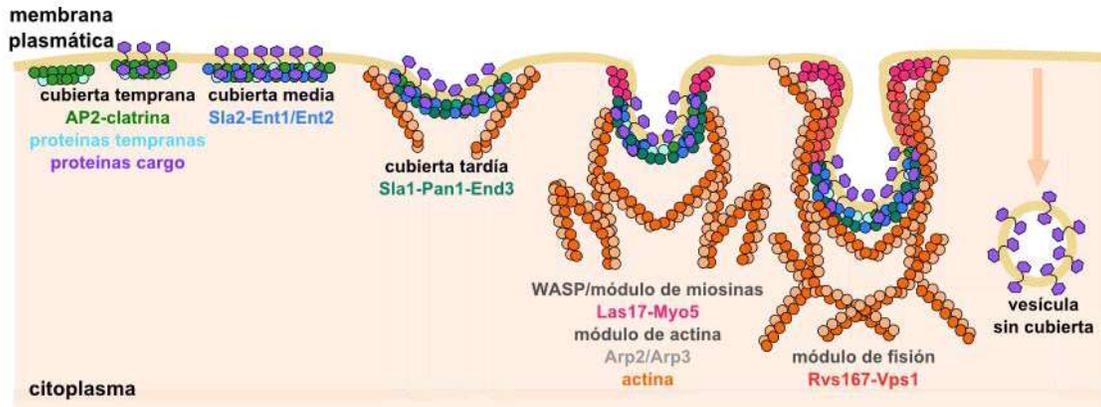
fusión de los endosomas tardíos y la vacuola. Este proceso requiere de la presencia del complejo de anclaje HOPS ( del inglés *homotypic fusion and protein sorting*), la SNARE vacuolar Vam3 y la GTPasa Ypt7 (38).

En la vía ALP, las vesículas formadas en el TGN son directamente transportadas a la vacuola. La existencia de esta vía fue descrita en experimentos donde la enzima fosfatasa alcalina es localizada correctamente a la vacuola incluso en cepas de levadura mutantes *vps* que son deficientes en la fusión entre vesículas de TGN y endosomas (39). En el TGN las proteínas *cargo* que siguen esta vía, como la SNARE vacuolar Vam3, son reclutadas específicamente dentro de vesículas cubiertas de clatrina conteniendo el adaptador AP-3 (40).

## Endocitosis y la Vía de Reciclado

La vía endocítica de transporte (END) permite a las células eucariotas la internalización de material extracelular y proteínas y lípidos de membrana. Generalmente se distinguen dos tipos de endocitosis: endocitosis de fase fluida y endocitosis mediada por receptor. La endocitosis de fase fluida es un proceso considerado constitutivo donde vesículas endocíticas se forman y secuestran material extracelular de forma no específica; por otro lado, la endocitosis mediada por receptor es considerada inducible ya que se dispara luego de la unión de un ligando con su receptor.

La levadura *S. cerevisiae* ha sido un organismo modelo invaluable para el estudio de la endocitosis. La ruta principal de ingreso a la célula en *S. cerevisiae*, es la endocitosis mediada por clatrina (EMC) (41), aunque se debe notar que endocitosis independiente de clatrina (EIC) ha sido reportada (42). La EMC es un proceso celular esencial altamente conservado. La internalización se inicia en sitios de la MP mediante el reclutamiento de clatrina vía el complejo adaptador AP-2 (cubierta temprana). De forma concomitante son reclutadas las proteínas *cargo* en los futuros sitios de invaginación. Esta etapa inicial finaliza con el reclutamiento de las epsinas Ent1 y Ent2 que interactúan con los fosfoinosítidos PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> y permiten reclutar el complejo Sla1-Pan1-End3 (cubierta tardía). La cubierta tardía es crucial para el alistado de la maquinaria de polimerización de actina (módulo WASP/miosinas) que genera la invaginación de la MP. Las17/WASP y las miosinas tipo I Myo3 y Myo5 son activadoras del complejo Arp2/3 que nuclea la polimerización de actina ramificada permitiendo la formación de la vesícula endocítica. La escisión de la vesícula ocurre por acción de las anfifisinas Rvs161 y Rvs167, que censan la curvatura de la membrana, y la dinamina Vps1. El rol de estas proteínas en la endocitosis se encuentra esquematizado de forma simplificada en la Figura 5. Una vez internalizada la vesícula, la cubierta de clatrina es desensamblada y la vesícula resultante funde con los endosomas tempranos. De esta forma, el material internalizado es transportado atravesando la vía endosomal hasta finalmente alcanzar la vacuola para su posterior degradación (43,44).



**Figura 5. Esquema del proceso de internalización endocítica.** Los sitios de endocitosis se inician con el reclutamiento de proteínas de endocitosis temprana y de clatrina mediante el complejo adaptador AP-2. En estos sitios se reclutan las proteínas que formarán el cargamento de la vesícula. El proceso de iniciación finaliza con la formación de la cubierta tardía. La invaginación comienza con el reclutamiento de WASP/módulo de miosinas que inicia la polimerización de actina ramificada por el módulo de actina. Las miosinas comprimen la MP mientras que el módulo de actina expande la invaginación. Una vez que la invaginación es suficientemente pronunciada, el módulo de fisión libera la vesícula en el citoplasma donde se pierde la cubierta (esquema adaptado de (43)).

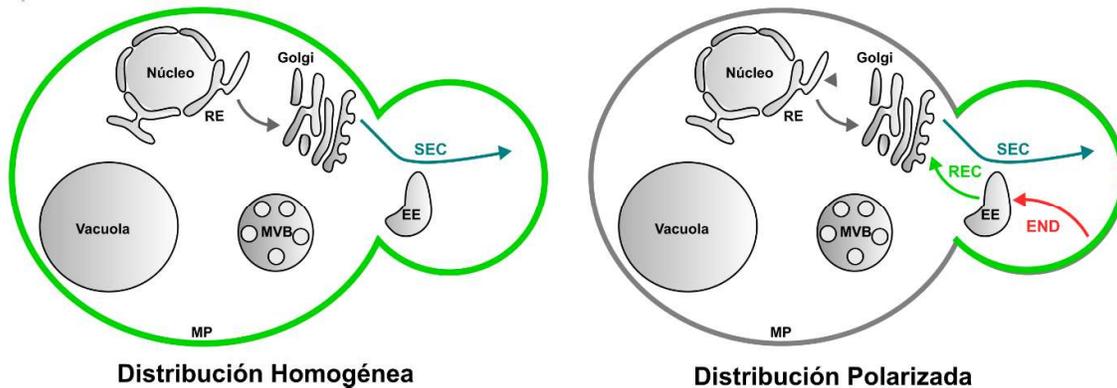
## La vía del reciclado

Después de ser internalizadas por endocitosis, generalmente, las proteínas se transportan a los endosomas y luego a la vacuola donde son degradadas como se describió anteriormente, pero varias proteínas se reciclan de nuevo a la MP luego de ser internalizadas. Por lo tanto, no son dirigidas a la vacuola, sino que siguen la vía de transporte retrógrado desde los endosomas al TGN donde son incorporadas nuevamente a la vía secretora. La ruta de reciclado (REC) desempeña un papel metabólico muy importante en las células, ya que permite la reutilización de proteínas tales como receptores y proteínas que forman parte de la maquinaria de transporte vesicular (ver Figura 4).

En *S. cerevisiae*, la proteína *cargo* de la vía de reciclado mejor estudiada es Snc1. Snc1 es una proteína transmembrana tipo II-ACT que pertenece a la familia de proteínas SNAREs (acrónimo del inglés *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) que median la fusión de membranas a lo largo de todas las vías de transporte vesicular. La SNARE vesicular Snc1 se localiza principalmente en la MP en los sitios de secreción (célula hija emergente). Snc1 media la fusión entre las vesículas secretoras y la MP, luego se internaliza y se recicla desde los endosomas tempranos al TGN desde donde se vuelve a secretar a la MP (45). El reciclado de Snc1 requiere de las GTPasas Ypt31/32 y de su proteína efectora Rcy1 (46,47).

## Endocitosis y polaridad en *Saccharomyces cerevisiae*

Muchas células presentan una distribución polarizada de algunas proteínas de la MP. Esta polarización es mantenida ya sea o por barreras físicas que impiden la difusión de las proteínas hacia el resto de la membrana (revisado en (46)) o por un mecanismo cinético. Esto último fue descrito inicialmente en fibroblastos, donde las proteínas exocitadas localmente presentan una localización polarizada si las mismas son endocitadas y recicladas a la MP antes de difundir hasta alcanzar el equilibrio (48). Particularmente en levadura, los filamentos de actina dirigen la exocitosis hacia la célula hija (o *bud*) o hacia la punta de los intermediarios de reproducción sexual llamados *shmoos* (49). De esta forma, en *S. cerevisiae*, la endocitosis y el reciclado de proteínas transmembrana pueden dar como resultado una distribución polarizada en la MP (50). Así es como la SNARE Snc1 alcanza su localización polarizada mientras que la SNARE Sso1, que no es activamente endocitada, presenta una distribución homogénea en la PM (ver Figura 6).



**Figura 6. Representación del fenotipo de distribución polarizada en *S. cerevisiae*.** En la levadura, la secreción de proteínas desde el Golgi hacia la MP se encuentra direccionada hacia la célula hija naciente (o hacia la punta del *shmoos* en estos intermediarios sexuales) a partir de donde difunden al resto de la célula madre. Debido a que la difusión de proteínas transmembrana en la MP de la levadura es particularmente lenta, la endocitosis y el reciclado de estas proteínas dan como resultado una distribución polarizada mantenida por este mecanismo cinético.

La distribución polarizada de proteínas es posible en las pequeñas células de levadura gracias a la lenta difusión de las mismas en la MP de este organismo, que es mucho más lenta en comparación con la difusión de proteínas en la MP de células animales. En el año 2003, Valdez Taubas y Pelham midieron mediante experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) los coeficientes de difusión de proteínas transmembrana en la MP de levadura y de células animales COS e informaron que los mismos son aproximadamente 0.0025 y 0.1  $\mu\text{m}^2/\text{s}$ , respectivamente. Esta lenta velocidad de difusión en la MP de levadura no requiere de la presencia de la pared celular ni del citoesqueleto de actina, pero si se ve afectada levemente en cepas mutantes de la síntesis del ergosterol, esterol constituyente de la MP (50).

Cuando a Sso1 se le adiciona en su dominio citoplásmico una señal de endocitosis conocida, como el motivo NPF, esta proteína mutante es incluida en las vesículas endocíticas y su localización cambia respecto de la proteína salvaje o *wild-type (WT)* presentando una distribución polarizada. Por otro lado, si se utiliza una mutante de Snc1 que no es sustrato de endocitosis (Snc1en-), esta mutante presenta una distribución homogénea sobre la MP. Esto indica que, a pesar de su pequeño tamaño, las células de levadura pueden usar la exocitosis localizada combinada con la endocitosis y reciclado como un mecanismo simple para mantener la polaridad de proteínas en la MP (50).

## Regulación de la endocitosis

La endocitosis se encuentra regulada por una variedad de señales que incluyen fosforilación, ubiquitinación y modificaciones lipídicas. Casi todas las proteínas involucradas directamente en este proceso son fosforiladas. Varias quinasas y sus respectivos sustratos se encuentran localizados en sitios de endocitosis. Sin embargo, también se ha mostrado que la actividad de otras quinasas que no localizan en sitios de endocitosis puede tener efecto sobre este proceso. El rol de la fosforilación y la ubiquitinación en la internalización de proteínas transmembrana se ha estudiado durante muchos años (revisado en (43)). En el modelo canónico, un receptor es fosforilado bajo la unión con su ligando, lo que resulta en su ubiquitinación, ya sea en forma de mono o poli-ubiquitinación, lo que lleva a su internalización mediante interacción de la ubiquitina con las proteínas de cubierta (51). La ubiquitinación de los dominios citoplásmicos de proteínas *cargo* transmembrana juega un rol importante en la EMC tanto en levadura como en mamíferos (52,53). En levadura, la ubiquitinación de las proteínas *cargo* es llevada a cabo casi exclusivamente por Rsp5, una ubiquitina-ligasa de la familia HECT (revisado en (54)), asistida generalmente por una serie de proteínas adaptadoras que incluye a la familia de arrestinas (55,56). Otros estudios también se han focalizado en el estudio de la ubiquitinación de las proteínas que componen la maquinaria de endocitosis. Varias de estas proteínas, como Sla1 (cubierta tardía) y Rvs167 (módulo de fisión) resultan ubiquitinadas. También la actividad de Edel (cubierta temprana) parece estar regulada por ubiquitinación (57).

Por otro lado, los lípidos tienen un rol muy importante en el proceso de endocitosis; sin embargo, el estudio del efecto de la composición lipídica *in vivo* resulta dificultoso, lo que obstaculiza un poco dilucidar sus funciones. El recambio de fosfatidilinositol 4,5-difosfato (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) es requerido para un correcto funcionamiento de la endocitosis (58,59). La importancia del PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> se ha demostrado utilizando mutantes que, o bien sobreexpresan o son deficientes en este fosfoinosítido. Por otro lado, estudios genéticos también sugieren que los esteroides y esfingolípidos tendrían un rol importante en la endocitosis. La delección de genes de enzimas de la biosíntesis de ergosterol, como ERG6 o ERG2, resulta en defectos parciales en la endocitosis que son exacerbados si se las combina con la delección de ERG3. También se ha mostrado que en una mutante termosensible *lcb1*, la cual es deficiente en la síntesis de esfingolípidos, la internalización de la feromona factor alfa (un *cargo* clásico de EMC) es sustancialmente defectuosa (60). Sin embargo, aún se desconocen las bases mecánicas para estos fenotipos.

## Señales de endocitosis

De acuerdo al modelo canónico, la selección de proteínas transmembrana para ser internalizadas por EMC involucra la presencia de señales de endocitosis en los dominios citoplásmicos de las proteínas *cargo*. Estas señales son reconocidas por distintos receptores o adaptadores que forman parte de la cubierta proteica y es mediante esta interacción que las proteínas *cargo* transmembrana son concentradas en los sitios endocíticos (revisado en (61)).

Existe una diversidad de señales de endocitosis presentes en los tallos citosólicos de proteínas transmembrana que puede clasificarse en tres grupos análogos funcionalmente pero estructuralmente diferentes descritos a continuación.

**(1) Motivos aminoácidos lineares.** Se tratan de arreglos invariantes y variantes de aminoácidos que incluyen a los motivos con “núcleo de tirosina” YXXØ (62) y [FY]XNPX[FY] (63), y los motivos con “núcleo de dileucinas” [DE]XXXL[LI] (64,65). En esta notación, los aminoácidos están representados en un código de una sola letra: X indica cualquier aminoácido, Ø indica un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica voluminosa, y los corchetes significan que cualquiera de estos aminoácidos puede ocupar esa posición. Los aminoácidos invariantes son los elementos más críticos, aunque los aminoácidos variantes influyen en la fuerza y especificidad fina de las señales. La función de estas señales puede verse afectada por fosforilación (66,67) o palmitoilación en aminoácidos cercanos (68) y también por el espaciamiento entre la señal y el TMD de proteínas transmembrana (69). Estos motivos lineares generalmente se encuentran en regiones no estructuradas de los dominios citoplásmicos.

**(2) Determinantes conformacionales.** Existen varios ejemplos de motivos estructurales que son capaces de determinar endocitosis. Estos motivos consisten en arreglos conformaciones de aminoácidos presentes en la superficie de la estructura proteica. Por ejemplo, se ha demostrado que las proteínas SNARE de mamíferos VAMP8, VAMP3 y VAMP2 se unen directamente a través de su dominio N-terminal al adaptador de clatrina CALM, y mutaciones en los aminoácidos de la interface de contacto CALM:SNARE inhibe la endocitosis de estas proteínas *cargo* (70). A diferencia de los motivos lineales, que son comunes para muchas proteínas, los determinantes conformacionales descritos hasta el momento parecen ser únicos para esa proteína *cargo* particular (71,72).

**(3) Modificaciones covalentes.** Las modificaciones covalentes, como la fosforilación de aminoácidos que contienen grupos hidroxilo (73,74) y la poli- o monoubiquitinación de residuos de lisina (51,75) en los dominios citosólicos también pueden funcionar como señales endocíticas. En estos casos, los grupos modificadores no modulan la actividad de motivos lineales subyacentes o determinantes conformacionales, sino que ellos mismos actúan como determinantes de internalización.

Es importante notar que es posible que señales múltiples estén presentes o superpuestas dentro del mismo dominio citosólico. Adicionalmente, si bien diferentes trabajos destacan el rol del TMD en el tráfico de proteínas a lo largo de la vía secretoria (principalmente en la salida del RE hacia el Golgi, y el transporte entre Golgi y MP) hasta la realización de esta tesis no se han descrito señales de

endocitosis presentes en el TMD de proteínas cargo, ya sea motivos aminoacídicos lineales, determinantes conformacionales o geométricos.

## Dominios de membrana

Con el conocimiento adquirido durante las últimas décadas ha comenzado a tomar mayor relevancia el hecho de que la organización espacio-temporal de las moléculas biológicas juega un rol importante en la regulación de diferentes procesos (76). Un método general mediante el cual las células alcanzan dicha organización es mediante el agrupamiento de biomoléculas. Uno de los ejemplos mejor estudiado de cómo las células utilizan el agrupamiento para organizar funcionalmente a las biomoléculas es la segregación de los lípidos y las proteínas de las membranas para formar nano- y micro-dominios (77,78). Está ampliamente aceptado que las membranas celulares contienen una variedad de dominios y que los mismos imponen una estructura local que impide la mezcla libre de los lípidos y proteínas que los conforman.

Un paradigma importante, que ha dado forma a gran parte de la información que hoy se tiene sobre dominios en membranas celulares, es el modelo de balsas lipídicas (del inglés *lipid rafts*). Tradicionalmente se definen estas balsas como una heterogeneidad nanoscópica de la membrana rica en esteroides, formadas como consecuencia de la separación de fase líquido-líquido de los lípidos. Este modelo simplificado de las membranas celulares ha proporcionado un banco de pruebas útil para generar y probar hipótesis sobre los mecanismos subyacentes que controlan la formación, tamaño y forma de los dominios en el entorno bidimensional de la membrana (revisado en (79)).

Muchas propiedades de los dominios de membrana pueden ser estudiadas en sistemas de membranas modelo utilizando técnicas basadas en microscopía convencional. Por ejemplo, la segregación de lípidos y proteínas puede ser directamente observada en vesículas gigantes de membrana plasmática (GPMVs), donde se forman dominios micrométricos coexistentes con características de diferente fase (80). Sin embargo, la información con la que se cuenta actualmente sostiene que en células vivas los dominios presentes son altamente dinámicos y tienen tamaños que rondan las decenas de nanómetros (35). Estas restricciones espaciales y temporales han dificultado el estudio de estos dominios *in vivo* mediante técnicas tradicionales de microscopía. Afortunadamente, durante la última década se han desarrollado avances en técnicas experimentales que han permitido una mejor comprensión de la organización nativa de las membranas abordando estos cuellos de botella.

Acompañando los avances tecnológicos que pueden ser utilizados para estudiar la arquitectura de la membrana, en los últimos años también ha evolucionado el entendimiento de las características funcionales de estos dominios. Se propone hace mucho tiempo que los dominios o balsas lipídicas segregan funcionalmente a los lípidos y proteínas dentro de diferentes compartimentos locales de una membrana, regulando así sus interacciones (79). Relacionada con la idea de que los dominios de membrana influyen en diferentes funciones biológicas está la cuestión de cómo ciertas proteínas son incluidas o no en dichos dominios. Se cree que varios factores contribuyen en este proceso. Se ha mostrado que modificaciones lipídicas de proteínas tales como la palmitoilación (81) o unión covalente a glicosilfosfatidilinositol (GPI) (82) serían motivos de inclusión a dominios con características de fase líquido ordenada. Además, ciertas proteínas pueden interactuar de forma específica con lípidos enriquecidos en un dominio particular. Finalmente, para proteínas transmembrana, durante los últimos

años ha tomado mayor relevancia la influencia del dominio transmembrana en la segregación de dichas proteínas a diferentes dominios. Muchas proteínas transmembrana son excluidas de dominios con características de balsas lipídicas, y la segregación de TMDs dentro de estos dominios de fase ordenada se ha considerado un proceso energéticamente desfavorable (83). Sin embargo, un número importante de proteínas transmembrana se encuentra asociado a dominios de fase líquido ordenada *in vitro*, incluso independientemente de modificaciones postraduccionales como la palmitoilación (81).

## **Dominios en membranas de *Saccharomyces cerevisiae***

En la membrana plasmática de *S. cerevisiae*, las proteínas pueden distribuirse de forma no homogénea formando diferentes patrones. Varias permeasas de aminoácidos, incluyendo a la permeasa de arginina Can1, segregan en el compartimento “tipo parche” MCC (por el inglés *membrane compartment occupied by Can1*), mientras la ATPasa de membrana Pma1 ocupa el compartimento “tipo red” MCP (84). Adicionalmente, dominios “tipo parche” también fueron descriptos para la localización del Complejo Tor 2 (85) y para sitios de ensamblado del módulo de actina necesario para la endocitosis (86), mientras que otras proteínas se han reportado como homogéneamente distribuidas (84). En el año 2012, Spira y colaboradores investigaron la distribución y dinámica de un set representativo de proteínas asociadas a la membrana plasmática de levadura utilizando microscopía TIRF (del inglés *Total internal reflection fluorescence microscopy*) acoplada a deconvolución 2D de las imágenes. Todas las proteínas analizadas presentan una distribución no-homénea en diferentes patrones que van desde estructuras punteadas hasta redes prácticamente continuas, y dichos patrones son fuertemente influenciados por la composición lipídica de la membrana. De manera interesante, la mayoría de las proteínas segregan a dominios diferentes del resto. Sin embargo, aquellas proteínas cuya secuencia de aminoácidos que componen sus dominios transmembrana son similares presentan mayor tendencia a colocalizar (87).

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los estudios sugieren que los dominios de tipo balsas lipídicas presentan dimensiones nanoscópicas cuando se los observa en membranas celulares *in vivo*. Una interesante excepción a esta característica surgió de la visualización de dominios micrométricos en las vacuolas de levaduras cuando las células entran en fase estacionaria de crecimiento (88). Estos microdominios pueden ser observados mediante microscopía de fluorescencia, y también han sido detectados usando microscopía electrónica con criofraccionamiento (89). Mientras aún no están del todo claras sus funciones biológicas, algunos reportes recientes sugieren que estos dominios en la membrana vacuolar son importantes para procesos como la lipofagia y la microautofagia (90). Las características de estos dominios vacuolares son reminiscentes de los dominios observados en sistemas de membranas modelo que exhiben separación de fases líquido ordenada (*lo*)-líquido desordenada (*ld*) ya que es posible observar en los mismos la segregación de distintas proteínas, sondas lipídicas o colorantes utilizados como marcadores de fases. De forma consistente con esta posibilidad, distintas evidencias sugieren que estos microdominios observados *in vivo* en levadura consisten en fases fluidas co-existentes formadas por un mecanismo de separación de fases, similar a lo que se observa en sistemas modelo (91).

# ANTECEDENTES Y PLANTEO DE OBJETIVOS

---

Diferentes estudios han mostrado que la geometría del dominio transmembrana (TMD) puede determinar la incorporación o no de proteínas transmembrana en diferentes etapas de la vía secretora (92,93). Por ejemplo, se propuso que TMDs largos se acomodan mejor en la membrana plasmática (MP) de las células, más ancha que la membrana del aparato de Golgi (16,18,92,94,95). Previamente al inicio de este trabajo de tesis, diferentes análisis bioinformáticos confirmaron que los TMDs de proteínas con un solo dominio transmembrana poseen formas organelo-específicas (17,96). Además, resultados de nuestro laboratorio indican que la geometría de los TMD, incluyendo el largo y el volumen de los aminoácidos que constituyen la mitad exoplásmica del mismo, podrían determinar retención de proteínas en el aparato de Golgi o su transporte a la MP para proteínas transmembrana tipo II, tanto en levaduras como en células de mamíferos (17). Usando SNAREs transmembrana, Quiroga y colaboradores mostraron que TMDs cortos con mitades exoplásmicas voluminosas resultan una señal de retención en el aparato de Golgi. También ha sido reportado que el largo del TMD influye en la eficiencia con la que proteínas transmembrana tipo I son excluidas de vesículas endocíticas cubiertas de clatrina en células de mamífero (14). Sin embargo, al momento de comenzar este trabajo de tesis la información acerca de cómo la forma del TMD influencia la clasificación de proteínas dentro de la vía endocítica era escasa. Es por eso que nos planteamos el siguiente **objetivo general** para esta tesis:

**Estudiar el rol de la geometría del dominio transmembrana en la endocitosis de proteínas transmembrana con un solo TMD.**

Para llevar a cabo este objetivo se realizaron diferentes ensayos utilizando como proteínas modelo a proteínas transmembrana de la familia SNARE. Estas proteínas cuentan con un solo paso transmembrana y son de topología tipo II-ACT (o *tail anchored proteins*). Para este trabajo de tesis planteamos diferentes objetivos específicos cuyos abordajes y resultados se encuentran desglosados en los siguientes capítulos de este trabajo:

- I. Estudiar y caracterizar una geometría particular del TMD como señal de endocitosis
  - I.A. Determinar si una geometría particular del TMD resulta un determinante de endocitosis en *S. cerevisiae* y, de ser así, caracterizar dicha señal endocítica.
  - I.B. Estudiar la presencia de TMDs endógenos de *S. cerevisiae* que actúen como señal de endocitosis.
  - I.C. Estudiar la funcionalidad de la nueva señal descrita en células eucariotas superiores.
  
- II. Analizar mecanismos posibles mediante los cuales actúan las señales presentes en los TMDs.
  - II.A. Indagar sobre posibles mecanismos moleculares mediante los cuales esta señal es funcional.
  - II.B. Analizar la influencia de la geometría de distintos TMDs en la partición a dominios de membrana *in vivo*.

# RESULTADOS

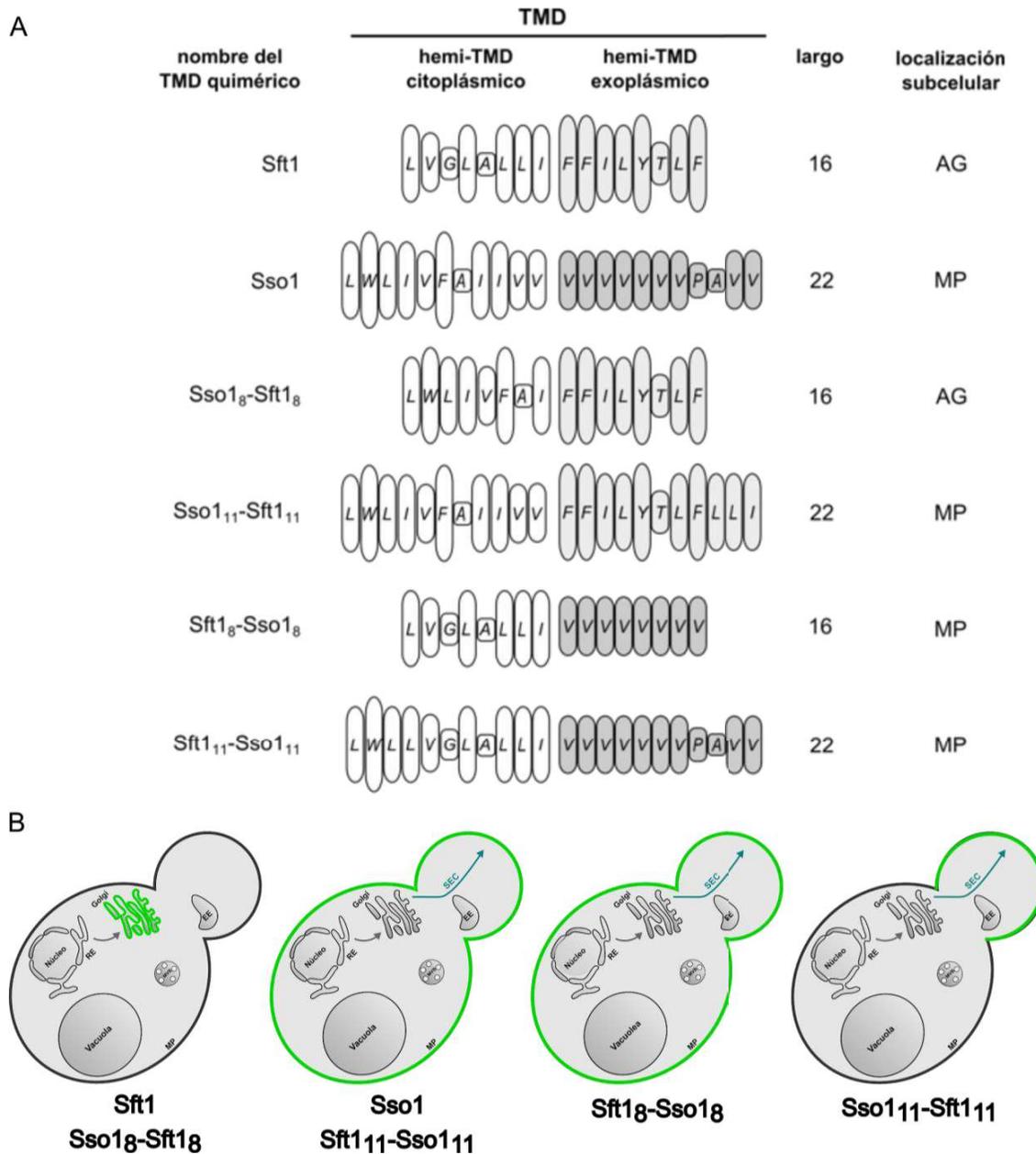
---

## **CAPÍTULO I: LA GEOMETRÍA DEL DOMINIO TRANSMEMBRANA ES UNA NOVEDOSA SEÑAL DE ENDOCITOSIS**

### **LA UN DOMINIO TRANSMEMBRANA LARGO CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA ES UNA SEÑAL DE ENDOCITOSIS Y POLARIDAD EN *S. cerevisiae***

Como parte de un análisis sistemático realizado en nuestro laboratorio donde se utilizó como proteínas modelo la SNARE de Golgi Sft1, la SNARE de MP Sso1 y proteínas con TMDs quiméricos generados a partir de los TMDs de las anteriores (ver Figura 7A), se determinó que un TMD corto y con aminoácidos voluminosos en su mitad exoplásmica resulta en una señal de retención en el aparato de Golgi. Además, TMDs cortos, pero con hemi-TMDs exoplásmicos poco voluminosos transitan la vía secretoria hacia la MP. Por otro lado, proteínas con TMDs largos localizan en la MP más allá del volumen de su mitad exoplásmica. Sin embargo, las quimeras que poseen un TMD largo con la mitad exoplásmica voluminosa presentan una distribución polarizada sobre la célula hija (Figura 7B). Teniendo en cuenta que en *S. cerevisiae*, una distribución polarizada en la MP puede ser el resultado de la endocitosis y el reciclado de proteínas transmembrana (50), nuestra primera aproximación, basada en estas observaciones experimentales previas, fue analizar si un TMD con una geometría particular (largo y voluminoso en su mitad exoplásmica) es capaz de determinar la endocitosis y reciclado de proteínas.

Como proteína modelo utilizamos la proteína transmembrana tipo II Sso1. Ésta es una proteína de la familia SNARE residente de la MP y que pertenece al grupo de las syntaxinas (97). El único TMD de Sso1, localizado en su extremo C-terminal, está formado por 22 residuos, y los aminoácidos que constituyen su mitad exoplásmica son en promedio poco voluminosos (ver Figura 8A). Sso1 presenta una distribución homogénea en la MP en células tanto en estado vegetativo como en intermediarios de reproducción sexual (*shmoos*). Sso1 no posee en su dominio citoplásmico ningún tipo de señal de endocitosis característica y por lo tanto no es activamente internalizada. En cambio, si alguna señal de endocitosis se adiciona en su extremo N-terminal, Sso1 es ahora internalizada y reciclada resultando en una distribución polarizada de la misma (50).

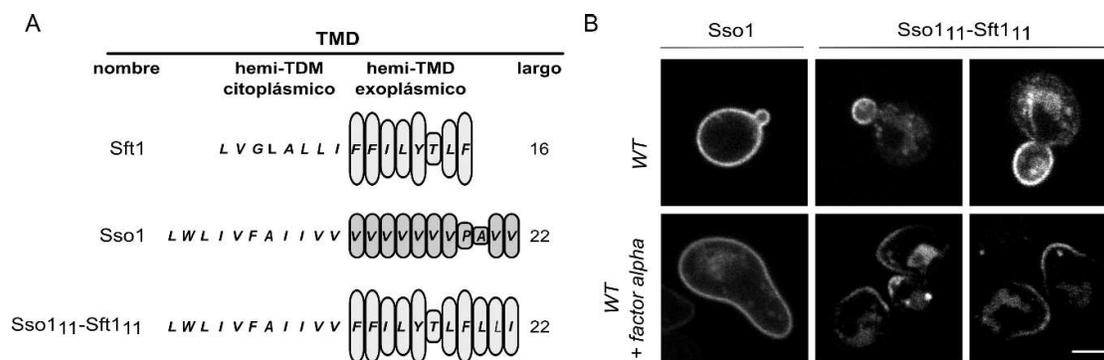


**Figura 7. Representación esquemática de dominios transmembrana y su localización subcelular.** Basado en los resultados de (17). Se indica la secuencia aminoacídica de cada uno de ellos, así como el largo del TMD, y la localización subcelular de estos TMDs quiméricos que se observó en experimentos *in vivo*. Se representa el volumen de cada aminoácido presente en el hemi-TMD exoplásmico mediante la altura de las celdas en las que se ven incluidos. Los volúmenes están representados a escala con la tabla de volúmenes utilizada en los análisis bioinformáticos (ver Apéndice I). El nombre de cada TMD quimérico se asignó de acuerdo al origen del hemi-TMD, con un subíndice indicando el número de aminoácidos que componen cada hemi-TMD.

## **Una versión mutante de Sso1 con un hemi dominio transmembrana exoplásmico voluminoso se localiza de forma polarizada en *S. cerevisiae***

En primer lugar, se generó un vector de expresión inducible por galactosa de la versión mutante de Sso1 en la cual la mitad exoplásmica de su TMD fue reemplazada por una versión extendida del hemi-TMD exoplásmico de la SNARE Sft1 y fusionada a GFP en el extremo N-terminal. Sft1 es una proteína SNARE transmembrana tipo II residente del aparato de Golgi, cuyo TMD posee 16 aminoácidos de largo y los aminoácidos que constituyen su mitad exoplásmica son en promedio voluminosos. La proteína quimérica resultante se nombró Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>); entre paréntesis se denota la información acerca de cómo está constituido el TMD (ver Figura 8A).

Se analizó la localización de estas proteínas mediante microscopía confocal de fluorescencia y se determinó que, a diferencia de Sso1, la proteína quimérica con un hemi-TMD exoplásmico voluminoso localiza en la MP de forma altamente polarizada en las células hijas (o *bud*) (Figura 8B, panel superior). Como se mencionó anteriormente, en *S. cerevisiae* una distribución polarizada en la MP puede ser el resultado de un mecanismo cinético de endocitosis y reciclado que concentra a las proteínas en el bud. Sin embargo, también se ha descrito que en el cuello que separa la célula hija de la madre se disponen un set de proteínas llamadas septinas que pueden actuar como barreras físicas evitando su difusión y dando como resultado el mismo fenotipo de polaridad (98). Para evaluar esta segunda posibilidad se analizó la localización de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en *shmoos* incubando las células con la feromona del sexo opuesto (en este caso factor  $\alpha$ ), ya que en estos intermediarios sexuales el anillo de septinas no está presente. Como puede observarse en la Figura 7B, panel inferior, Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) mantiene su distribución polarizada sobre la punta de los *shmoos*. Este resultado indica que la acumulación de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en la MP de la célula hija no se debe a una barrera física que impida su difusión.



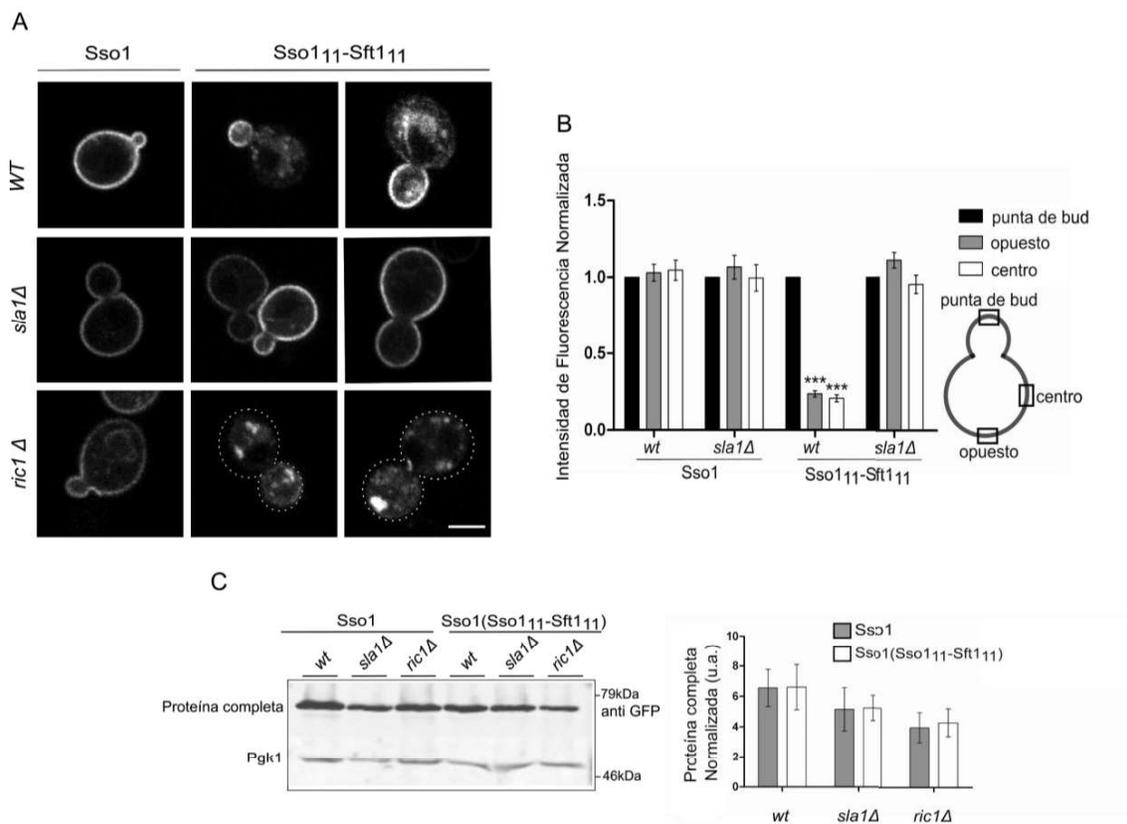
**Figura 8. Un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es un determinante de polaridad en *S. cerevisiae*.** **A.** Representación esquemática del TMD *WT* y quimérico de *Sso1*. El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. El TMD quimérico está nombrado de acuerdo con el origen de cada hemi-TMD, con subíndices mostrando el número de aminoácidos. *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) posee una versión extendida del hemi-TMD exoplásmico de *Sft1*. **B.** *Sso1* y la versión modificada como en (A) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa de levadura salvaje (*WT*-*mat a*) y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia. Para observar la localización de estas proteínas en shmoo se incubó las células en presencia de la feromona del sexo opuesto, en este caso factor  $\alpha$ . Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

## La distribución polarizada de *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) se mantiene mediante endocitosis y reciclado a la membrana plasmática

Para confirmar que la distribución polarizada de *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) se debe a que esta quimera es sustrato de endocitosis y reciclado se observó su localización en diferentes cepas mutantes de delección que tienen afectadas las diferentes vías de transporte. Por un lado, se transformó y observó con microscopio confocal la localización de *Sso1* y la mutante en la cepa *sla1Δ*. En esta mutante, deficiente en la endocitosis mediada por clatrina (99), *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) se observa en la MP, pero la distribución polarizada se pierde (Figura 9A). Esto indica, que la endocitosis mediada por clatrina es necesaria para mantener el fenotipo de polaridad observado en una célula *WT*. Por otro lado, se transformó y observó la localización en la cepa *ric1Δ*, donde la endocitosis ocurre normalmente pero la vía de reciclado entre endosomas y TGN se encuentra bloqueada (100). Como se puede observar en la Figura 9A, *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) se encuentra casi exclusivamente asociada a membranas intracelulares, mientras *Sso1* permanece en la MP.

Con el objetivo de obtener una medida cuantitativa de la polaridad, se determinó la intensidad de fluorescencia en la MP de la punta de la célula hija y sobre la MP de la célula madre en el centro y en el extremo opuesto al bud. Los valores normalizados de fluorescencia en distintas cepas se muestran en la Figura 9B. Esta cuantificación confirma una distribución polarizada de *Sso1*(*Sso1*<sub>111</sub>-*Sft1*<sub>111</sub>) en la cepa *WT* y la pérdida de esa polaridad en la cepa *sla1Δ*. Los niveles de expresión fueron controlados

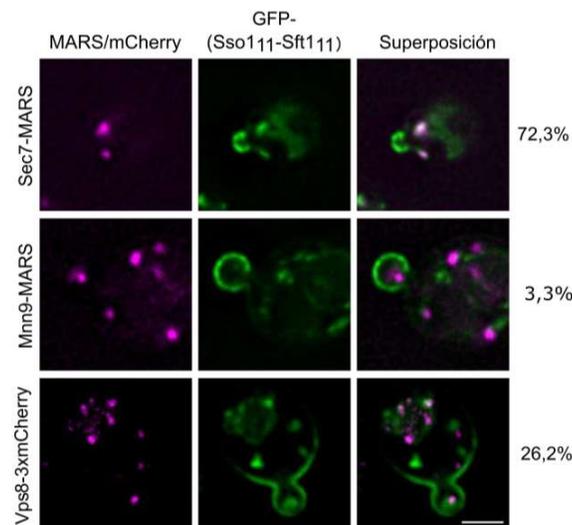
mediante ensayos de *Western blot*. Ambas proteínas se expresan en niveles similares para cada una de cepas analizadas (Figura 9C).



**Figura 9. La distribución polarizada de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se mantiene mediante endocitosis y reciclado.** **A.** Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa *WT* o mutantes, y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la polaridad. La intensidad de fluorescencia de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en la MP se midió en el extremo de la célula hija (bud), y en el centro y extremo opuesto de la célula madre. Para cada célula la intensidad de fluorescencia fue normalizada al valor de intensidad de la fluorescencia en el bud como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M, n=20 células. **C.** Los niveles de expresión de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a GFP en cepas *WT* o mutantes fueron analizados mediante ensayos de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP (panel izquierdo). Pgk1 se usó como control de carga. En el panel derecho se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando “two-way ANOVA” con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza (P<0.05).

Mientras Sso1 se visualiza exclusivamente en MP en una cepa salvaje, Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) también puede observarse en compartimentos intracelulares. Con el fin de conocer la identidad de dichos compartimentos, se realizaron ensayos de localización de la proteína mutante con diferentes marcadores de la vía secretora y endocítica en colaboración con la Dra. Ayelén González Montoro

(Universidad de Osnabrück, Alemania). Se expresó la quimera Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionada a GFP en cepas que expresan las proteínas Sec7 (marcador de TGN), Vps8 (marcador de endosomas tardíos) o Mnn9 (marcador de Golgi) fusionadas a proteínas fluorescentes rojas (MARS o Cherry) y se contó la cantidad de estructuras intracelulares colocalizando respecto del total, para cada caso. De este análisis se concluyó que los compartimentos intracelulares en los que Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) localiza, corresponden mayormente a TGN (72,3 % de coincidencia). También se observó colocalización con endosomas tardíos (26,2% de coincidencia) y prácticamente no se encontraron estructuras que colocalizaran con el marcador de Golgi (3,3% de coincidencia) (Figura 8D).

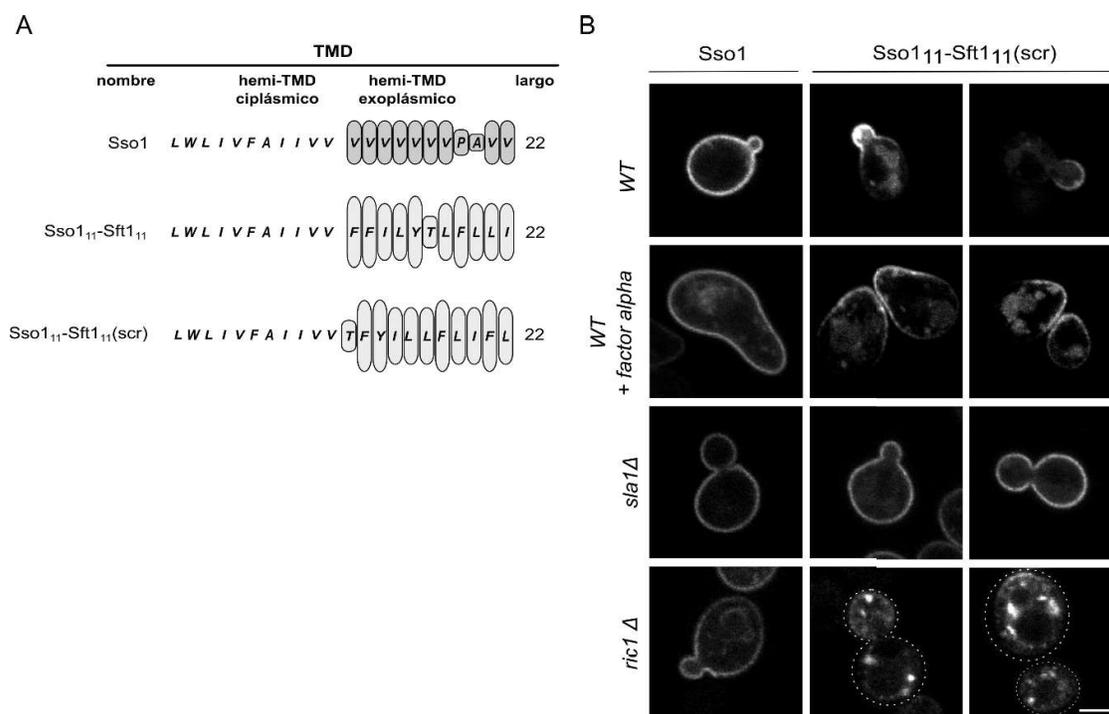


**Figura 10. Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) co-localiza con marcador de la red de *trans* Golgi.** GFP-Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fue transformada en levaduras *WT* que expresan de forma estable Sec7-MARS (marcador de TGN), Mnn9-MARS (marcador de Golgi) o Vps8-3xCherry (marcador de endosomas tardíos) y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia. El 72% de todas las estructuras marcadas por Sec7-MARS también poseen marca fluorescente verde correspondiente a Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>). n= 100. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

## La endocitosis de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se debe al largo y volumen del hemi dominio transmembrana y no a la secuencia de aminoácidos

Para descartar que la señal presente en Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no se debe a la secuencia primaria particular con la que el TMD fue diseñado, se construyó otra proteína mutante donde el orden de los aminoácidos que componen la mitad exoplásmica fue alterado de forma aleatoria (ver Figura 11A). De este modo, se modificó la secuencia lineal del hemi-TMD exoplásmico de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) sin cambiar el volumen promedio del mismo. A esta nueva proteína quimérica se la nombró Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr.

Se analizó la localización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr mediante microscopía confocal de fluorescencia y se determinó que, a diferencia de Sso1, la proteína mutante localiza en la MP de forma altamente polarizada en las células hijas. Además, al igual que Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>), la polaridad de la mutante “scr” se mantiene en los intermediarios de reproducción sexual (Figura 11B). Cuando se analizó la localización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr en cepas mutantes de delección que tienen afectadas diferentes vías de transporte, se observó que la polaridad se pierde en la mutante *sla1Δ*, deficiente en la endocitosis mediada por clatrina mientras que en la cepa *ric1Δ*, donde la vía de reciclado se encuentra bloqueada, la proteína mutante se encuentra casi exclusivamente intracelular (Figura 11B). Estos experimentos confirman que la endocitosis de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se debe al volumen de su hemi-TMD exoplásmico y no a la secuencia de aminoácidos que lo componen.



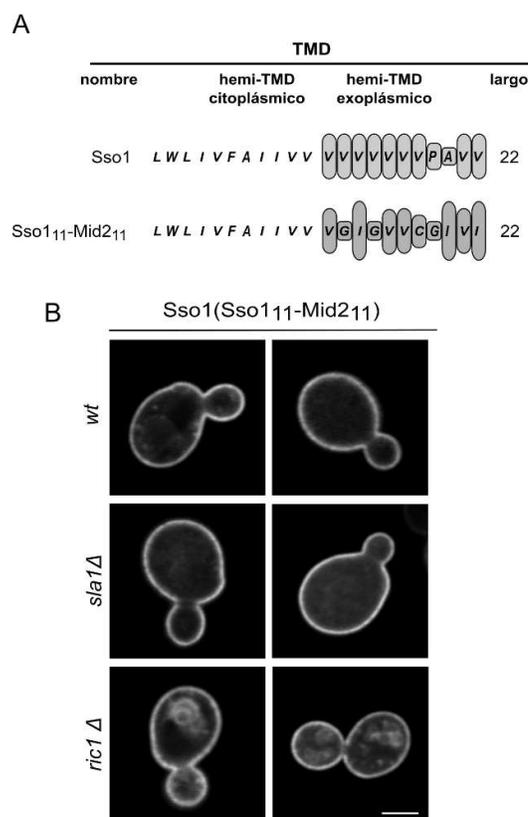
**Figura 11. Localización subcelular y tráfico de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr.** **A.** Representación esquemática del TMD salvaje de Sso1, de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) y de la mutante Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr resultante de alterar aleatoriamente el orden de los aminoácidos del hemi-TMD exoplásmico de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>). **B.** Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)scr fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa *WT* o mutantes, y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

## El dominio transmembrana de Sso1 no es una señal de retención en la membrana plasmática

Es formalmente posible que el TMD particular de Sso1 medie interacciones que “protejan” a la proteína de ser internalizada, por ejemplo, excluyéndose de sitios de inicio de endocitosis. Si esto es

así, la ausencia del hemi-TMD exoplásmico poco voluminoso de Sso1 y no la presencia del hemi-TMD exoplásmico voluminoso es lo que resultaría en la internalización de las proteínas mutantes.

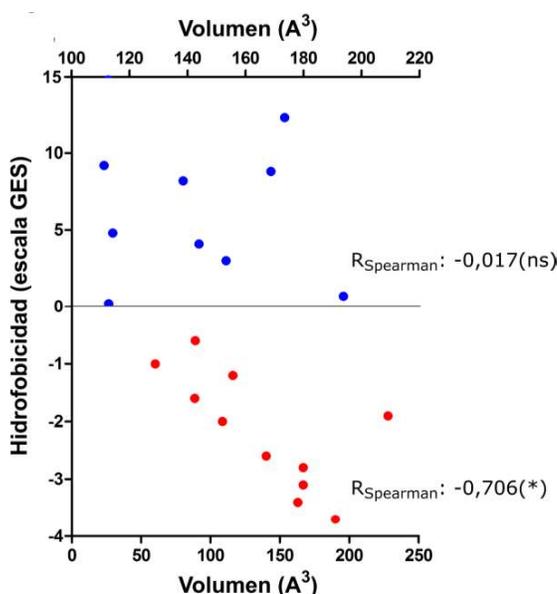
Para evaluar esta posibilidad construimos una proteína quimérica donde el hemi-TMD de Sso1 fue reemplazado por el hemi-TMD también largo y poco voluminoso de la proteína Mid2 (Figura 12A). Mid2 es una proteína transmembrana tipo II que funciona como sensor de integridad de la pared celular (101). Elegimos esta estrategia en lugar de realizar un TMD mutante de Sso1 alterando el orden de los aminoácidos ya que su TMD está compuesto mayormente por residuos de valina. Alterar el orden del hemi-TMD exoplásmico de Sso1 resultaría en un hemi-TMD prácticamente idéntico al original (ver Figura 12). La nueva proteína quimérica, que se nombró Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>), fusionada a GFP fue transformada en una cepa de levadura salvaje (*WT*) y mutantes, y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia. La Figura 12B muestra que Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>) se localiza casi exclusivamente en la MP donde presenta una distribución homogénea. Además, su localización en MP no se ve afectada en cepas mutantes *slat1Δ* o *ric1Δ*, similar a lo que ocurre con Sso1.



**Figura 12. Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>) no se encuentra polarizada en la membrana plasmática. A.** Representación esquemática del TMD salvaje de Sso1 y de la mutante Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>). El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. **B.** Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa de levadura *WT* o mutantes, y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

## El volumen del hemi-dominio transmembrana y no su hidrofobicidad es un determinante de endocitosis

Se evaluó la relación entre el volumen y la hidrofobicidad de los diferentes aminoácidos y se calcularon los coeficientes de correlación de Spearman y Pearson para aminoácidos hidrofóbicos (Figura 13, puntos rojos) y no hidrofóbicos (Figura 13 puntos azules) y sus respectivos volúmenes. Para ello se utilizaron los valores de la escala de hidrofobicidad de GES, la cual recopila específicamente la hidrofobicidad de los aminoácidos en alfa-hélices, tal como los TMDs (102) (Apéndice 1). Dicho análisis reveló que para los aminoácidos más hidrofóbicos existe una correlación significativa entre en el volumen y la hidrofobicidad de los mismos.



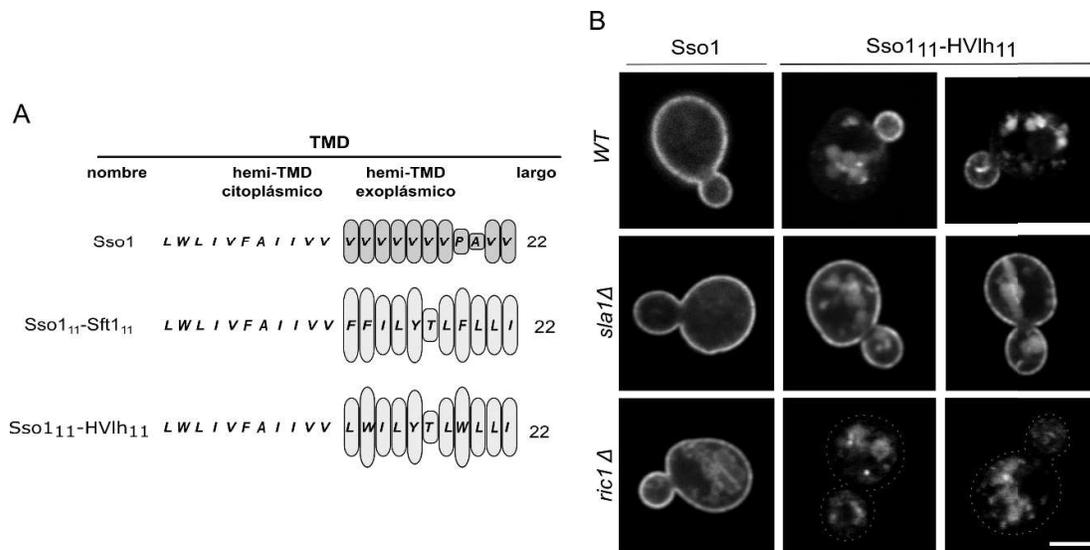
**Figura 13. Correlación entre el volumen y la hidrofobicidad de los aminoácidos.** Gráfica de dispersión de volumen vs. hidrofobicidad de aminoácidos. En rojo se colorearon los aminoácidos hidrofóbicos y en azul los no hidrofóbicos. Se evaluó la correlación de valores para cada grupo mediante test de correlación de Spearman y Pearson obteniéndose resultados similares:  $R_{\text{SpearmanH}} = -0,706$   $R_{\text{PearsonH}} = -0,687$  con correlación significativa (\*);  $R_{\text{SpearmanNH}} = -0,017$   $R_{\text{PearsonNH}} = -0,069$  con correlación no significativa (ns). Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza ( $\alpha=0.05$ ).

Debido a que los TMD están compuestos casi exclusivamente por aminoácidos hidrofóbicos, aquellos TMD más voluminosos posiblemente también sean más hidrofóbicos. En la Tabla 1, se enumeran los valores de volumen e hidrofobicidad de los hemi-TMD de las proteínas quiméricas estudiadas en este Capítulo.

Hemi-DTM exoplásmico	Volumen (Å <sup>3</sup> )	Hidrofobicidad
Sso1	132,85	-2,25
Sso1 <sub>11</sub> -Mid2 <sub>11</sub>	122,63	-2,25
Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub>	168,30	-2,64

**Tabla 1. Volumen e hidrofobicidad promedio de los hemi dominios transmembrana exoplásmicos de Sso1, Mid2<sub>11</sub> y Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>.** La hidrofobicidad se calculó como el promedio de los valores para cada aminoácido según la escala de hidrofobicidad GES.

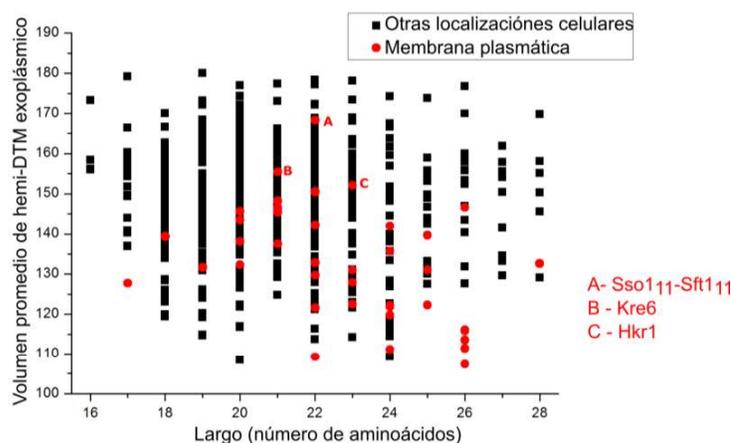
Con el objetivo de discriminar si es la hidrofobicidad, el volumen o ambas características de los hemi-TMD la que es capaz de actuar como una señal endocítica, generamos el constructo artificial Sso1(Sso1<sub>11</sub>-HVlh<sub>11</sub>) (HVld por su nombre en inglés “high-volume low-hydrophobicity”). En dicho constructo se reemplazaron los tres residuos de fenilalanina del hemi-TMD exoplásmico de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) por dos triptófanos y una leucina, los cuales son aminoácidos menos hidrofóbicos de acuerdo a la escala GES (Figura 14A). Estos cambios resultan en un hemi-TMD en promedio voluminoso (175,64 Å<sup>3</sup>) pero con una hidrofobicidad promedio similar a la del hemi-TMD de Sso1 (-2,23). Este nuevo TMD fusionado al dominio citosólico de Sso1 y a GFP fue transformado en células de levadura y analizado mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 14B muestra que esta proteína se encuentra polarizada en la cepa salvaje, que esta distribución se pierde en la mutante *sla1Δ* y que es retenida en el interior celular en la mutante *ric1Δ*. Este resultado indica que la endocitosis es determinada por el volumen y no por la hidrofobicidad de los hemi-TMDs exoplásmicos.



**Figura 14. El volumen y no la hidrofobicidad del hemi-TMD exoplásmico es un determinante endocitosis.** **A.** Representación esquemática del TMD salvaje de Sso1, de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) y de la mutante Sso1(Sso1<sub>11</sub>-HVlh<sub>11</sub>). El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. **B.** Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-HVlh<sub>11</sub>) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa *WT* o mutantes, y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 2 μm.

## I.B DOMINIOS TRANSMEMBRANA ENDÓGENOS CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA PUEDEN ACTUAR COMO SEÑAL DE ENDOCITOSIS Y POLARIDAD EN *S. cerevisiae*

Los TMDs largos con un hemi-TMD exoplásmico voluminoso analizados hasta el momento se tratan de construcciones artificiales diseñadas por nosotros a partir de la combinación de los TMDs de Sso1 y Sft1 (ver Figura 8A) y variaciones del mismo. Con el fin de estudiar la presencia de esta nueva señal de endocitosis en proteínas endógenas de *S. cerevisiae*, se realizó un análisis bioinformático en colaboración con la Dra. Ayelén Gonzalez Montoro. El proteoma de *S. cerevisiae* fue analizado *in silico* como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Como resultado se obtuvo una lista de 755 proteínas que por predicción poseen un único paso transmembrana. 37 de estas proteínas están anotadas en bases de datos como residentes de la MP (Apéndice 2).



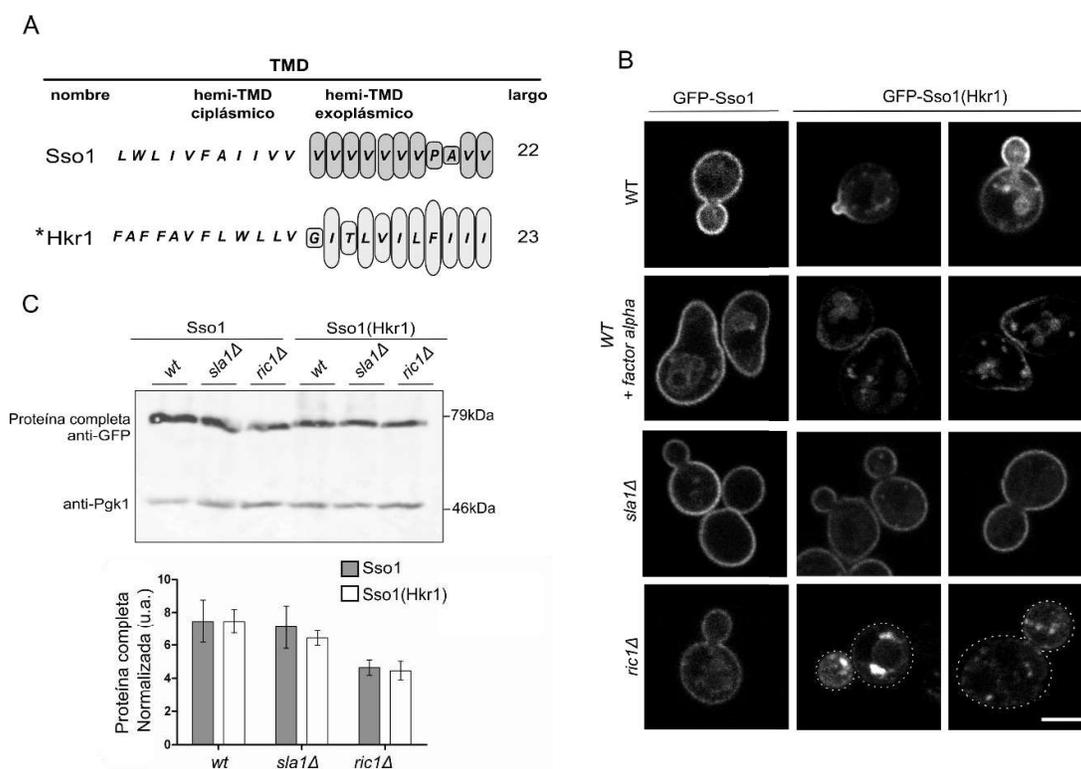
**Figura 15. Análisis bioinformático de la geometría del dominio transmembrana de proteínas de *S. cerevisiae* con solo un TMD.** Gráfico del largo del TMD vs. el volumen promedio del hemi-TMD exoplásmico de proteínas de membrana con un solo paso transmembrana de levadura. Las proteínas residentes de MP se indican en color rojo. El volumen fue calculado como el promedio del volumen de los aminoácidos que componen la mitad exoplásmica. Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) está incluida como referencia.

La Figura 15 muestra un gráfico del volumen promedio de los aminoácidos que componen la mitad exoplásmica versus el largo de cada uno de los TMDs encontrados. Los puntos que representan proteínas residentes de MP están coloreados de rojo. Dos de las proteínas de MP que poseen un hemi-TMD exoplásmico de mayor volumen promedio son Hkr1 y Kre6. Mediante una búsqueda bibliográfica, encontramos que estas proteínas se localizan de forma polarizada en la MP, por lo que las seleccionamos para realizar nuestros ensayos experimentales. Para ello, se generaron proteínas quiméricas donde el TMD de la SNARE Sso1 fue reemplazado por el TMD de Hkr1 o Kre6 (Sso1(Hkr1) y Sso1(Kre6) respectivamente) y se analizó el transporte de las mismas.

## El dominio transmembrana de Hkr1 funciona como señal de endocitosis

Hkr1 es una proteína de membrana tipo I involucrada en el control de osmosis celular (103). Con el fin de estudiar si el TMD de esta proteína es una señal de endocitosis, generamos una proteína quimérica entre el dominio citoplásmico de Sso1 y el TMD de Hkr1 (Figura 16A). Como Hkr1 es una proteína de membrana tipo I, la secuencia de aminoácidos del TMD fue invertida para mantener la orientación espacial de cada hemi-TMD.

Se analizó la localización de Sso1(Hkr1) fusionada a GFP mediante microscopía confocal de fluorescencia y se determinó que, a diferencia de Sso1, la proteína quimérica con un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso localiza en la MP de forma altamente polarizada tanto en los *buds* de células en estado vegetativo o en la punta de los *shmoos* (Figura 16B, paneles superiores). También pudimos determinar que esta distribución es dependiente de endocitosis y reciclado ya que la polaridad se pierde en células mutantes *sla1Δ*, sumado a que la proteína quimérica se acumula en estructuras intracelulares en células *ric1Δ* (Figura 16B). El nivel de expresión de Sso1 y Sso1(Hkr1) fue analizado mediante ensayos de *Western blot* y se corroboró que es similar en cada una de las cepas analizadas (Figura 16C).

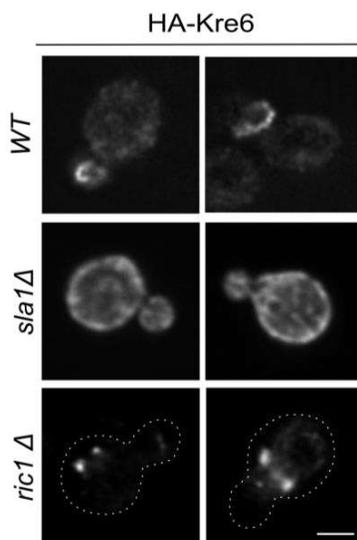


**Figura 16. El TMD de Hkr1 se comporta como una señal de endocitosis y determinante de polaridad.** A. Representación esquemática de los TMD de Sso1 y \*Hkr1 predicho por Phobius. \*El orden de los aminoácidos mostrados corresponde a la secuencia invertida de Hkr1, tal como debería

estar presente en la quimera Sso1(Hkr1). El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. **B.** Sso1 y Sso1(Hkr1) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa *WT* o mutantes, y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu\text{m}$ . **C.** Los niveles de expresión de las proteínas fusionadas a GFP en las distintas cepas fueron analizados mediante ensayos de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP (panel superior). P<sub>gk1</sub> se usó como control de carga. En el panel inferior se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M.

## El dominio transmembrana de Kre6 puede determinar endocitosis

Kre6 es una proteína de membrana tipo II involucrada en la síntesis de  $\beta$ -1,6-glucano y presenta una localización polarizada en la MP (104). Nosotros mostramos mediante ensayos de inmunofluorescencia seguidos de microscopía confocal que esta polaridad es mantenida por endocitosis y reciclado de la proteína. Como muestra la Figura 17 la distribución polarizada de Kre6 se pierde en la cepa *sla1 $\Delta$* , la cual es deficiente en EMC. Por otro lado, HA-Kre6 se observa retenida en compartimentos intracelulares cuando se expresa en la cepa mutante *ric1 $\Delta$* , donde la internalización endocítica ocurre normalmente pero el reciclado a la MP se encuentra bloqueado.

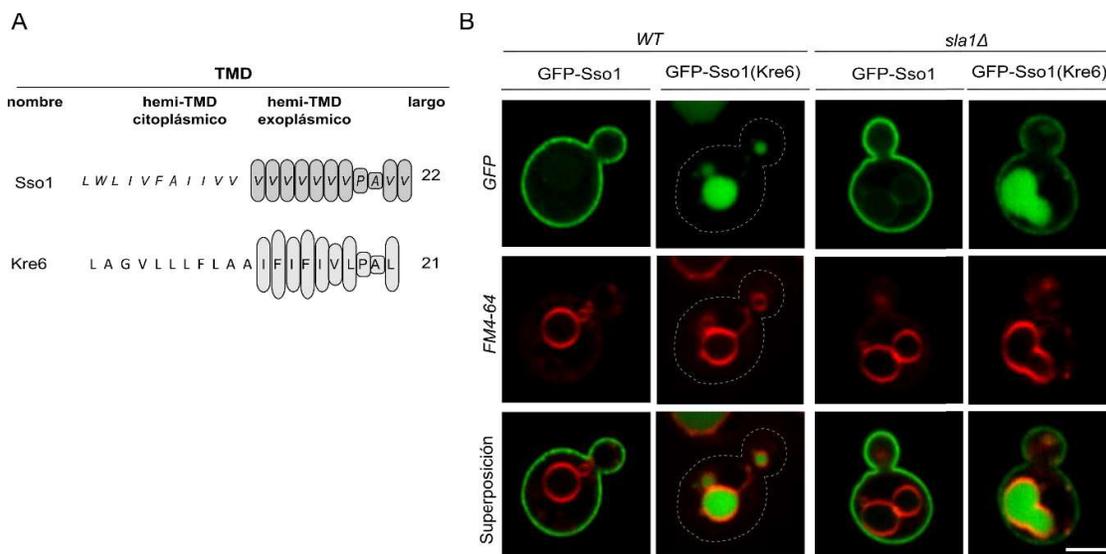


**Figura 17. HA-Kre6 se encuentra polarizada mediante endocitosis y reciclado.** Cepas *WT*, *sla1 $\Delta$*  y *ric1 $\Delta$*  fueron transformadas con un vector de expresión de HA-Kre6. La proteína fue detectada mediante inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpo monoclonal anti-HA y observada con microscopio confocal. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu\text{m}$ .

La predicción del TMD de Kre6 realizada con *Phobius* dice que este posee 21 aminoácidos de largo y que aquellos que componen su mitad exoplásmica son en promedio voluminosos (ver esquema

Figura 18A). Para estudiar si solo el TMD de Kre6 es capaz de dictar la endocitosis de una proteína generamos una quimera fusionando dicho TMD al dominio citoplásmico de Sso1 y lo expresamos en células *WT* y mutantes.

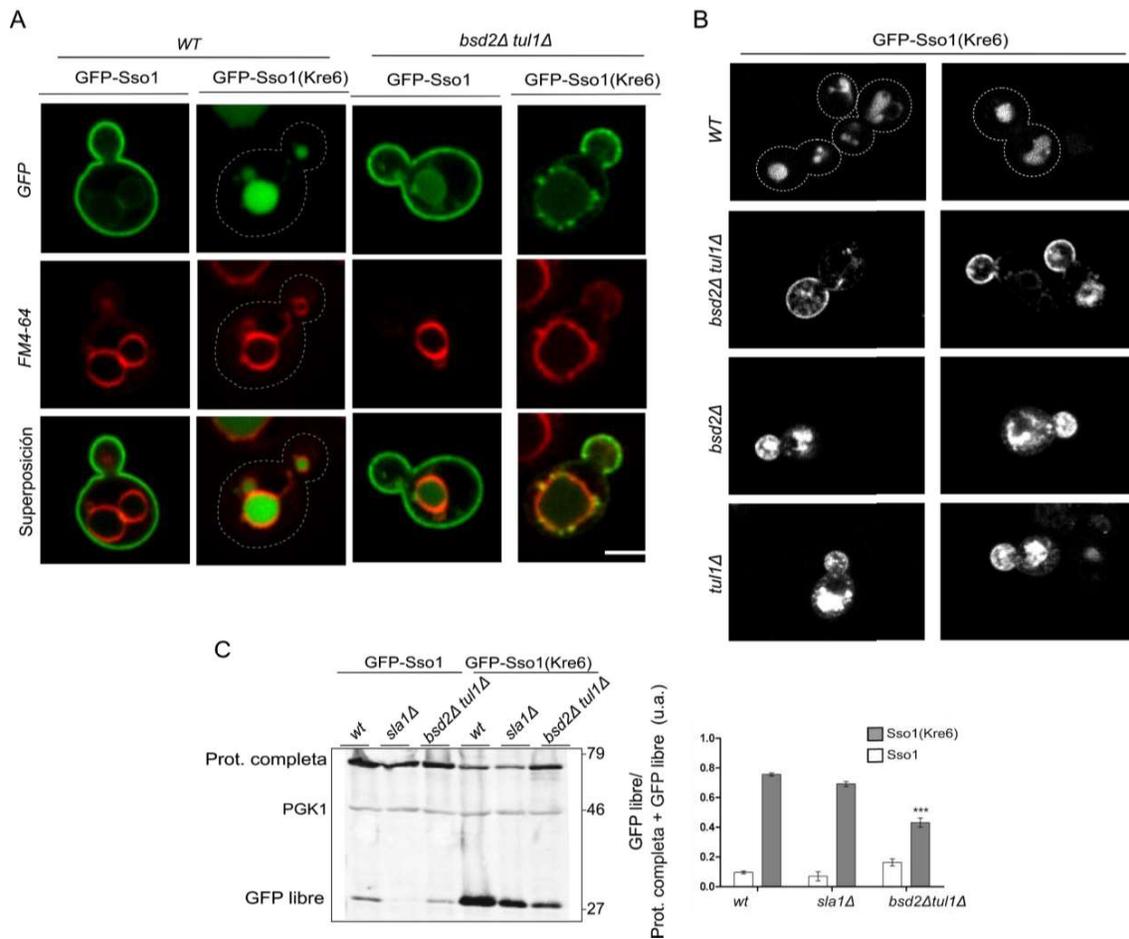
Usando microscopía confocal determinamos que la proteína quimérica, fusionada a GFP localiza en el lumen vacuolar (Figura 18B). Esta localización fue establecida mediante tinción de la membrana de las vacuolas con el colorante lipofílico FM4-64. Esta localización es indicativa de que posiblemente la proteína está siendo degradada. Es importante destacar que la proteína fluorescente verde (GPF) es resistente a la degradación vacuolar. Los altos niveles de degradación de Sso1(Kre6) fueron comprobados mediante ensayos de *Western Blot* donde se cuantificó la cantidad relativa de GFP libre respecto de la proteína quimérica completa (ver más adelante). Sin embargo, cuando la quimera es expresada en la cepa *sla1Δ*, es posible observar fluorescencia acumulada en la MP distribuida de forma no-polarizada, ya que en esta cepa la proteína no se puede internalizar. Esto sugiere que una fracción de esta quimera es transportada a la MP en una cepa salvaje, pero es activamente removida de esta localización y degradada.



**Figura 18. Localización intracelular de Sso1(Kre6).** **A.** Representación esquemática de los TMD de Sso1 y Kre6 predicho por Phobius. El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. **B.** Localización subcelular de GFP-Sso1 y GFP-Sso1(Kre6) (verde) en cepas *WT* y mutante observadas mediante microscopía confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante lipofílico FM4-64 que marca la membrana vacuolar (rojo). Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

Un posibilidad es que esta proteína quimérica sea reconocida por el control de calidad de proteínas transmembrana localizado en el aparato de Golgi, que involucra a la proteína adaptadora de ubiquitin ligasa Bsd2 (105) y a la ubiquitin ligasa Tul1 (106). Ambas proteínas forman parte de esta maquinaria, reconociendo y ubiquitinando proteínas transmembrana, lo que constituye una señal para su tráfico y degradación en la vacuola (organela degradativa equivalente a los lisosomas en células de

mamíferos). La expresión de Sso1(Kre6) en la cepa mutante *bsd2Δtul1Δ*, resulta en una disminución de la degradación de la quimera y en su localización en la MP con una distribución polarizada (Figura 19 A). Al analizar la localización de GFP-Sso1(Kre6) en las cepas mutantes simples *bsd2Δ* y *tul1Δ* se observa que una porción de la proteína alcanza la MP con una distribución polarizada, pero sigue existiendo degradación de la misma, indicando que la proteína quimérica es sustrato tanto de Bsd2 como de Tul1 (Figura 19B).



**Figura 19. El TMD de Kre6 puede determinar endocitosis y polaridad en la membrana plasmática.** **A.** Localización subcelular de GFP-Sso1 y GFP-Sso1(Kre6) (verde) en cepas *WT* y mutante observadas mediante microscopía confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante lipofílico FM4-64 que marca la membrana vacuolar (rojo). Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m. **B.** Localización subcelular de GFP-Sso1 y GFP-Sso1(Kre6) en cepas salvaje (*WT*) y mutantes observadas mediante microscopía confocal. **C.** La degradación vacuolar de GFP-Sso1 y GFP-Sso1(Kre6) se analizó mediante ensayos de *Western blot* (panel izquierdo). La degradación fue cuantificada como la relación entre GFP libre (resistente a la proteólisis vacuolar) y el total de proteína marcada con GFP (proteína completa + GFP libre). Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M, n=3. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando “two-way ANOVA”

con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza ( $P < 0.05$ ).

La distribución de Sso1(Kre6) en la cepa *bsd2Δtul1Δ*, confirma que la proteína transita la vía de endocitosis y reciclado una vez que alcanza la MP. En una cepa *WT*, la quimera al ser endocitada puede ser reconocida nuevamente por la maquinaria de control de calidad cuando se encuentra ciclando a través del Golgi lo que resulta en su completa relocalización a la vacuola. En una cepa *sla1Δ*, la mayor fracción de proteína está localizada en el lumen vacuolar, posiblemente de forma directa desde el Golgi. Estos resultados se condicen con los niveles de GFP libre observados mediante ensayos de *Western blot* como se muestra en la Figura 19C, donde en la mutante *sla1Δ* el nivel de GFP libre es prácticamente igual que en la cepa *WT* mientras que en la doble mutante *bsd2Δtul1Δ* el nivel de GFP libre se reduce considerablemente. En conjunto, estos resultados indican que el TMD de Kre6 es una señal de endocitosis funcional.

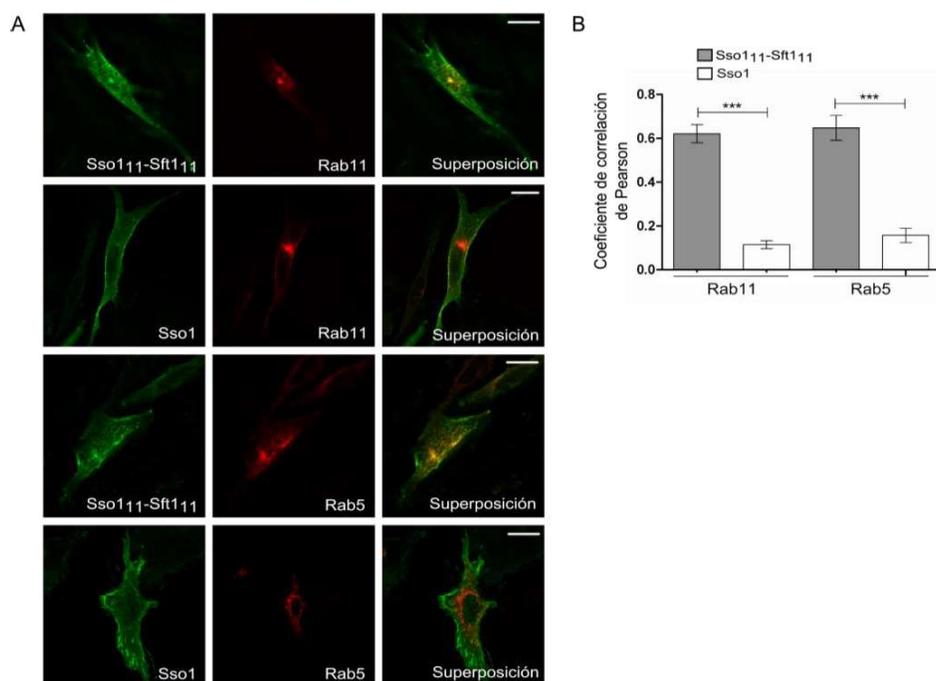
## I.C UN DOMINIO TRANSMEMBRANA LARGO CON LA MITAD EXOPLÁSMICA VOLUMINOSA FUNCIONA COMO SEÑAL DE ENDOCITOSIS EN CÉLULAS CHO-K1

Estudios bioinformáticos e *in vivo* realizados en nuestro laboratorio confirmaron que la geometría del hemi-TMD exoplásmico es capaz de definir la localización de proteínas transmembrana tipo II en Golgi o la MP en células de mamífero (17). Al igual que en *S. cerevisiae*, para que una proteína integral de membrana sea retenida en el Golgi mediante el mecanismo mediado por dominios transmembrana, su TMD debe ser corto y voluminoso en su hemi-TMD exoplásmico. Las proteínas que poseen TMDs largos y/o poco voluminosos en su hemi-TMD exoplásmico son exportadas del Golgi hacia la MP. También, análisis *in silico* de los TMDs presentes en el proteoma de *Arabidopsis* mostraron tendencias similares a las mencionadas en levadura y vertebrados (107), sugiriendo que estas características de los TMDs son de hecho determinantes generalizados de residencia en el aparato de Golgi o transporte a la MP.

En el presente capítulo investigamos si un TMD largo y voluminoso en su mitad exoplásmica, que actúa como señal de endocitosis para proteínas de *S. cerevisiae*, es también una señal funcional en eucariotas superiores.

### **Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se localiza en compartimentos endosomales en células CHO-K1**

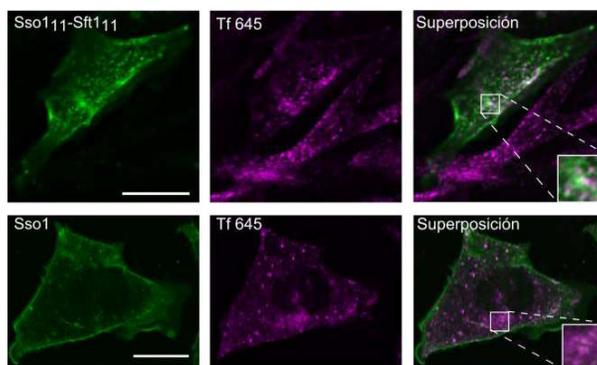
Con el objetivo de probar si un TMD con su mitad exoplásmica voluminosa también es una señal de endocitosis funcional en células de mamífero, analizamos la localización subcelular de la SNARE Sso1 y la mutante Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en células CHO-K1 en cultivo. Para ello fueron clonadas en el vector pmCherry1 y pmGFP1 de Clontech, que tienen el marcador fluorescente mCherry o GFP en el extremo N-terminal de su sitio de clonado. La localización subcelular de cada constructo fue analizado *in vivo*, 16 horas post-transfección mediante microscopía confocal. Como ya había sido demostrado, la SNARE de levadura Sso1 localiza casi exclusivamente en la MP de células CHO-K1 (17). Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) también localiza en la MP, pero a diferencia de Sso1, se observa en estructuras intracelulares (Figura 20A). Se realizaron co-transfecciones con vectores que expresan el marcador de endosoma de reciclado Rab11 y endosomas tempranos Rab5 (108), ambos acoplados a la proteína fluorescente YFP. Análisis de co-localización de las SNAREs quiméricas con estos marcadores indicaron que la marca intracelular observada para Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) corresponde tanto a endosoma de reciclado como a endosomas tempranos (Figura 20A).



**Figura 20. Localización subcelular de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en células CHO-K1.** A. Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a mCherry fueron expresadas en células CHO-K1 y observadas por microscopía confocal de fluorescencia (verde). Las células también fueron marcadas con YFP-Rab11 (endosoma de reciclado) o YFP-Rab5 (endosomas tempranos) (rojo). Barra de tamaño corresponde a 10  $\mu$ m. B. Imágenes de microscopía como en A. fueron cuantificadas y se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para cada caso. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M, n=20 células. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando “two-way ANOVA” con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza (P<0.05).

Los experimentos de colocalización fueron cuantificados aplicando máscaras binarias y los coeficientes de correlación de Pearson de fluorescencia de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) respecto de cada marcador fueron calculados (Figura 20B).

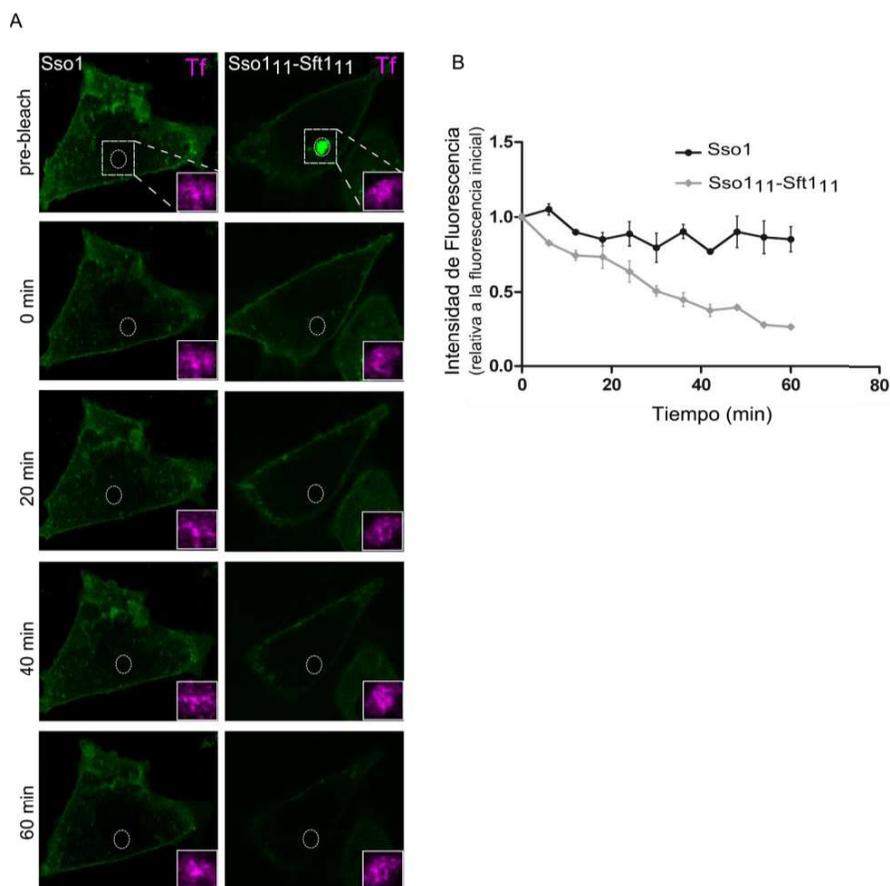
La localización de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en endosoma de reciclado también fue confirmada mediante experimentos de colocalización con Transferrina Alexa-Fluor 647, ligando fluorescente del receptor de transferrina, una proteína modelo clásica en el estudio del transporte endocítico en células de mamíferos (Figura 21). Estos resultados confirman que una cantidad sustancial de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se encuentra presente en estructuras endosomales sugiriendo que la proteína es incluida en la vía endocítica.



**Figura 21. Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) colocaliza con Transferrina-Alexa Fluor 647.** Células CHO-K1 transfectadas con GFP-Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) (verde) fueron posteriormente incubadas con Transferrina Alexa-Fluor 647 (magenta) y analizadas por microscopía confocal de fluorescencia. Barra de tamaño corresponde a 10 μm.

### **Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es activamente internalizada en células CHO-K1**

Era formalmente posible que Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) alcance compartimentos endosomales por una vía diferente a la vía endocítica. Por este motivo, para confirmar que esta proteína quimérica es activamente endocitada desde la MP realizamos experimentos de microscopía *in vivo* utilizando la técnica conocida como FLIP por sus siglas en inglés (*Fluorescence Loss In Photobleaching*). Brevemente, en esta técnica se monitorea la pérdida de la fluorescencia en un área distinta a la región foto-apagada. El fotoblanqueo de la proteína se realiza de manera repetitiva en la zona seleccionada, mientras que se recolectan imágenes de la totalidad de la célula. Si las moléculas fluorescentes pueden difundir al área apagada, la pérdida de la fluorescencia será notoria en ambos lugares, indicando que los mismos están conectados y que la proteína puede difundir entre ellos (109). Por lo tanto, usando FLIP podemos evidenciar si Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) trafica de forma activa entre la MP y endosoma de reciclado. Con este fin, células CHO-K1 fueron transfectadas con mCherry-Sso1 o Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) y 16 horas después, incubadas con Transferrina Alexa-Fluor 647. Posteriormente fueron tratadas con cicloheximida para evitar la síntesis de proteínas. La región del endosoma de reciclado, marcado con la sonda fluorescente, fue seleccionada y repetidamente irradiada cada 2 minutos durante 60 minutos fotoblanqueando la fluorescencia allí presente (Figura 22A). Posteriormente, se cuantificó la intensidad de fluorescencia correspondiente a la MP para Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) a distintos tiempos. Como puede observarse en la Figura 22B, más del 70% de intensidad de fluorescencia de la quimera mCherry-Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se pierde en la MP durante el fotoblanqueo del endosoma de reciclado mientras que la intensidad de fluorescencia correspondiente a Sso1 permanece estable. Estos resultados indican que Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es activamente internalizada desde la MP en células CHO-K1, siendo su hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso una señal de endocitosis funcional en este tipo celular.



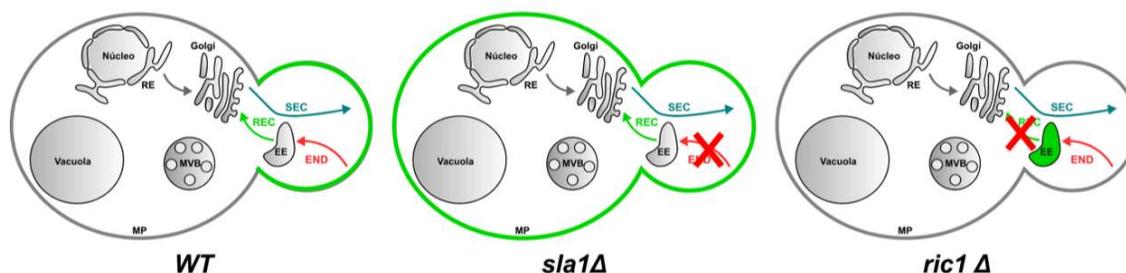
**Figura 22. Un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es endocitado en células CHO-K1.**

**A.** Experimento de FLIP. Células CHO-K1 fueron transfectadas con GFP-Sso1 o Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) y los endosomas de reciclaje fueron marcados usando Tf-Alexa Fluor 647 (pseudo-coloreada en magenta) como control interno, y tratadas con CHX 1 hora previo al inicio del experimento. Las imágenes mostradas son fotos representativas de lo observado a distintos tiempos (*pre-bleach*, 0, 20, 40 y 60 minutos). El *bleaching* de la fluorescencia verde fue repetido cada 3 minutos en la región marcada por el círculo blanco (identificada por co-localización con endosomas de reciclaje). **B.** Cuantificación de A. La intensidad de fluorescencia de la MP fue medida a partir de imágenes tomadas cada 6 minutos. La intensidad de fluorescencia promedio ( $\pm$ S.E.M.) en la MP, relativa al valor inicial, se graficó en función del tiempo.

## I.D DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Los experimentos realizados indican que un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es un parámetro crítico en el transporte de proteínas con un TMD largo, cuya localización está mediada por el dominio transmembrana. El reemplazo del hemi-TMD exoplásmico de Sso1 por aminoácidos más voluminosos resultó en un cambio en la localización de esta proteína desde una distribución homogénea a una distribución polarizada en la MP. Además, mientras la proteína salvaje se observa casi exclusivamente en la MP, la mutante con el hemi-TMD más voluminoso también se encuentra presente en compartimentos intracelulares, principalmente TGN.

Utilizando diferentes cepas mutantes, donde se encuentran bloqueadas vías de transporte particulares pudimos determinar que el fenotipo de polaridad observado para las proteínas con TMD largos y voluminosos en su mitad exoplásmica es mantenido mediante endocitosis y reciclado (ver esquema Figura 23). Adicionalmente observamos que la polaridad se mantiene cuando las células entran en estado de reproducción sexual. Teniendo en cuenta que el dominio citoplásmico de Sso1 no presenta señales de internalización, proponemos que un TMD largo con una mitad exoplásmica voluminosa es una señal de endocitosis novedosa ya que, a diferencia de las señales descritas hasta el momento, se encuentra presente en el dominio transmembrana de la proteína y no es su tallo citoplásmico.

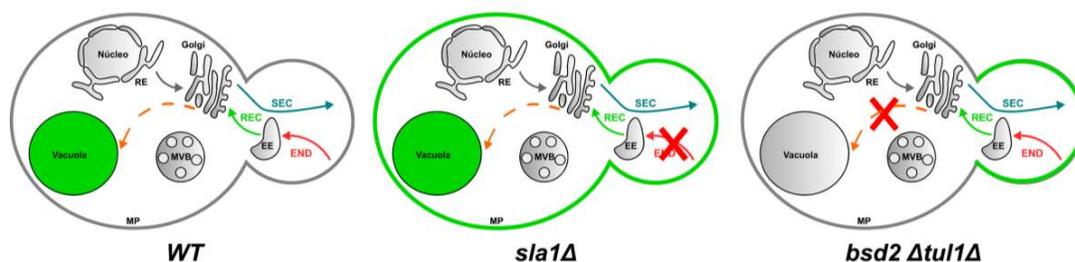


**Figura 23. Representación de localización y transporte de proteínas transmembrana tipo II con un TMD largo y un hemi-TMD exoplásmico voluminoso.** Las proteínas quiméricas estudiadas en este capítulo presentan una distribución polarizada sobre la MP de la célula hija cuando se expresan en una cepa *WT*. Pudimos determinar que esta distribución es dependiente de endocitosis y reciclado ya que la polaridad se pierde en células mutantes *sla1Δ* y a que la proteína quimérica se acumula en estructuras intracelulares en células *ric1Δ*.

Como parte de la caracterización de esta señal de endocitosis descrita se generaron diferentes proteínas quiméricas que comparten las características geométricas del TMD, pero difieren en otros aspectos. Utilizando estas quimeras se demostró que la señal de endocitosis dada por el volumen del hemi-TMD es independiente de su secuencia aminoacídica primaria y se concluyó que es el volumen del hemi-TMD y no su hidrofobicidad lo que resulta en un determinante de endocitosis.

Si bien en las últimas décadas se han hecho muchos avances respecto a dilucidar el rol de los TMDs en la localización y función de proteínas transmembrana, la información sobre su rol como determinantes de tráfico entre distintas organelas sigue siendo escasa. La identificación de una señal de

endocitosis codificada por la geometría del TMD representa un avance en el entendimiento de la influencia de los TMD en el transporte intracelular de proteínas transmembrana. Esta observación fue validada utilizando los TMDs de dos proteínas endógenas de *S. cerevisiae*: Hkr1 y Kre6. Reemplazar el TMD de Sso1 por el de Hkr1 resulta en un cambio en la localización de la proteína de una distribución homogénea a una distribución polarizada mantenida por endocitosis y reciclado. Por otro lado, la quimera Sso1(Kre6) resulta degradada en una cepa salvaje mientras una pequeña población de proteína se acumula en la MP de forma no polarizada cuando bloqueamos la endocitosis. Sin embargo, si evitamos su degradación encontramos que el TMD de Kre6 puede determinar endocitosis y polaridad en la MP (ver esquema Figura 24). Sso1(Kre6) es localizada a la vacuola, donde es degradada, porque esta quimera particular es reconocida y posiblemente ubiquitinada en el Golgi por Bsd2 y Tull1, dos proteínas involucradas en la degradación de proteínas transmembrana que localizan (o transitan a través del Golgi). ¿Por qué ésta quimera es reconocida para ser degradada y no así Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) o Sso1(Hkr1), por ejemplo, siendo que comparten el mismo dominio citoplásmico y tampoco la proteína Kre6 endógena con quien comparte el mismo TMD? Hay trabajos donde muestran que sistema de control de calidad de proteínas compuesto por Bsd2 y Tull1 reconocería TMDs compuestos por aminoácidos polares expuestos a la bicapa lipídica (106). Sin embargo, como se mencionó antes la proteína Kre6 que, por supuesto tiene su TMD salvaje, no es reconocida por este sistema y transita la vía secretoria sin inconvenientes. Podemos suponer que la quimera Sso1(Kre6) presenta un plegamiento particular (diferente al de Sso1 y al de Kre6) que deja expuestos residuos que son reconocidos por Bsd2/Tull1, pero más estudios al respecto deberían llevarse a cabo.



**Figura 24. Esquema de localización y transporte de la proteína quimérica GFP-Sso1(Kre6).** En verde se representa la localización de Sso1(Kre6) en cepas salvaje y mutantes *sla1Δ* y *bsd2Δtul1Δ*. En la cepa doble mutante, utilizada para evitar la degradación de la quimera, la misma presenta una distribución polarizada sobre la MP de la célula hija.

Los resultados observados en *S. cerevisiae* fueron esencialmente reproducidos en células de mamífero. La localización subcelular mediada por dominios transmembrana es un mecanismo que parece hallarse conservado a lo largo del dominio *Eukarya*. En trabajos anteriores al comienzo de esta Tesis se mostró que tanto el largo como el volumen del hemi-TMD exoplásmico, son factores conservados que diferencian los transmembranas de proteínas que localizan al Golgi o a la MP. A su vez, alterar estas propiedades de los TMDs produce un cambio en la localización subcelular en células de mamífero de manera similar a lo observado en levaduras. Resulta interesante que Mercanti y colaboradores en el año 2010, en células de mamífero (CHO-K1) y usando proteínas quiméricas de la

glicoproteína de superficie de células-T CD1b mostró que TMDs de cierto largo son efectivamente excluidos de vesículas con cubierta de clatrina (14). Nosotros analizamos la geometría de los TMD analizados en dichos experimentos y todos ellos poseen hemi-TMDs relativamente poco voluminosos. El análisis completo de las proteínas transmembrana tipo I y tipo II realizado en nuestro laboratorio por Quiroga y colaboradores muestra que hay una tendencia de las proteínas residentes de la MP de poseer un hemi-TMD poco voluminoso. Sin embargo, la distribución en cuanto a largo y volumen es amplia y existe un número significativo de proteínas con un hemi-TMD largo y voluminoso. Aquí mostramos, utilizando proteínas quiméricas de levadura, que incrementar el volumen de la mitad exoplásmica del TMD puede funcionar como una señal de endocitosis en células de mamífero sugiriendo que esta también se trataría de una señal conservada. El análisis bioinformático de proteínas de membrana de organismos eucariotas superiores con un solo paso transmembrana y anotadas como residentes de MP (set de datos generado por (17)), indica que más del 14% de las mismas posee un TMD relativamente largo (más de 20 aminoácidos) con un hemi-TMD exoplásmico voluminoso (más de 145 Å<sup>3</sup>). Por esto proponemos que la señal aquí descrita podría ser una señal de endocitosis funcionalmente activa para proteínas endógenas de distintos organismos. A posterior, sería interesante realizar estudios utilizando como modelo proteínas endógenas de mamíferos para evaluar el funcionamiento de esta señal en condiciones naturales y determinar, tal como lo hicimos en levadura, si únicamente la presencia de un TMD largo con la mitad exoplásmica voluminosa es capaz de dictar la endocitosis de dichas proteínas en ausencia de señales citoplásmicas.

## **CAPÍTULO II: ESTUDIOS SOBRE EL MECANISMO DE ENDOCITOSIS MEDIADA POR DOMINIOS TRANSMEMBRANA**

### **II.A RSP5 AFECTA DE FORMA INDIRECTA LA ENDOCITOSIS DE PROTEÍNAS CON DOMINIOS TRANSMEMBRANA LARGOS Y VOLUMINOSOS EN SU MITAD EXOPLÁSMICA**

La endocitosis de proteínas transmembrana, está controlada por mecanismos complejos que incluyen clatrina, adaptadores y reguladores de actina. Muchos de los genes que codifican para estas proteínas se encuentran conservados en levadura, sin embargo, cepas mutantes en dichos genes no presentan fenotipos observables; lo que sugiere que la endocitosis en este organismo está sujeta a diferentes mecanismos regulatorios.

Estudios en *S. cerevisiae* han demostrado que, al igual que en eucariotas superiores, diferentes módulos de proteínas son reclutados a los sitios de endocitosis en una dada secuencia temporal. Clatrina y diferentes adaptadores forman parte del módulo de cubierta temprana que establece los sitios de inicio de internalización; mientras el módulo de cubierta tardía combina la formación de la cubierta hasta la polimerización de actina, regulada por el módulo de actina, llegando finalmente a la escisión de la vesícula y su posterior internalización. Varios de los genes involucrados en la maquinaria endocítica, no resultan en cepas con defectos en endocitosis observables cuando son mutados. Algunos de estos factores puede tener homólogos funcionalmente redundantes o tener un rol sobre proteínas *cargo* específicas. Adicionalmente, factores no identificados podrían regular la endocitosis de diferentes proteínas (revisado en (43)).

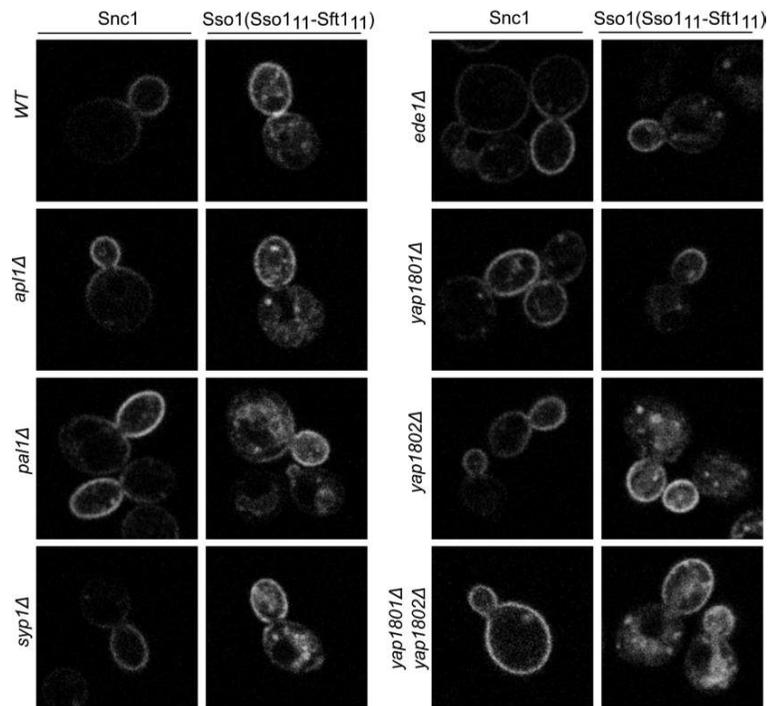
En la primera parte de este capítulo de la Tesis, analizamos grupos de proteínas que, planteando diferentes hipótesis, surgen como candidatas a posibles receptores específicos requeridos para la internalización de nuestra proteína quimérica modelo Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>).

### **La polarización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no se ve afectada en mutantes de endocitosis temprana**

Para comprender cómo estos hemi-TMDs largos y voluminosos son endocitados nuestra primera aproximación fue identificar un potencial rol de aquellas proteínas que se ha demostrado localizan tempranamente en los sitios de inicio de endocitosis. Estas proteínas incluyen a Apl1, Pall, Syp1, Ede1 y Yap1801/2. (110). Para ello analizamos la localización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en cada una de las cepas mutantes de genes que codifican para estas “proteínas endocíticas tempranas”. Como control de este análisis utilizamos a la SNARE vesicular Snc1, una proteína transmembrana tipo II que presenta una localización polarizada mantenida por ciclos de endocitosis y reciclado. A diferencia de nuestras quimeras, Snc1 presenta una señal de endocitosis en su dominio citoplásmico (45). Snc1 se eligió como control de este estudio (y de los siguientes en este capítulo) con el objetivo de poder

diferenciar, en el caso de encontrar alguna, aquellas proteínas que afecten de forma específica la internalización (y por lo tanto la distribución polarizada) de quimeras con señal de endocitosis dada por su TMD. En este primer análisis también incluimos a la doble mutante de Yap1801 y Yap1802, dos adaptadores específicos requeridos para la endocitosis de Snc1(111).

Como muestra la Figura 25, no observamos ningún efecto sobre la distribución polarizada de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en ninguna de las cepas mutantes estudiadas. Además, en la doble mutante *yap1801Δyap1802Δ* la endocitosis de Snc1 se ve fuertemente afectada por lo que presenta una distribución homogénea en la MP, pero no ocurre lo mismo con la quimera Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>). Este resultado nos indica que posiblemente el mecanismo de selección de proteínas para ser endocitadas es diferente si dicha proteína *cargo* presenta una señal de endocitosis en su dominio citosólico o en su TMD.



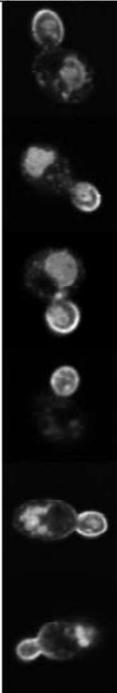
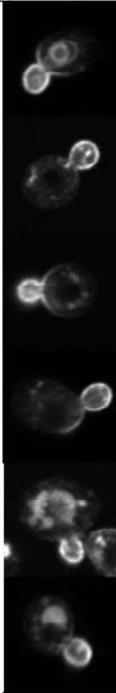
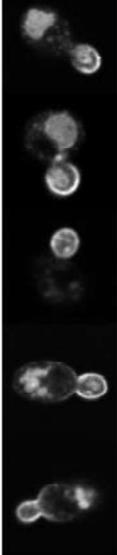
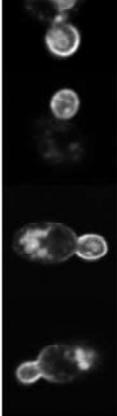
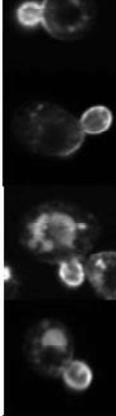
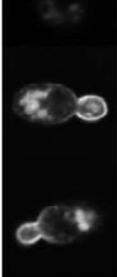
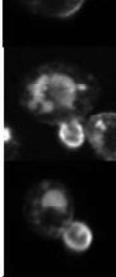
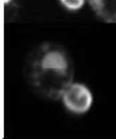
**Figura 25. La endocitosis de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no es afectada por proteínas de endocitosis tempranas.** Snc1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a GFP fueron transformadas en una cepa *WT* o mutantes, y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia.

### **Búsqueda de posibles receptores endocíticos para Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>)**

Como fue mencionado anteriormente, de acuerdo al modelo clásico, la selección de proteínas transmembrana para ser internalizadas por EMC involucra la presencia de señales de endocitosis en los dominios citoplásmicos de las proteínas *cargo*. Estas señales son reconocidas por distintos receptores o adaptadores que forman parte de la cubierta proteica y es mediante esta interacción que las proteínas

*cargo* transmembrana son concentradas en los sitios endocíticos. Un receptor que reconoce la geometría del TMD ha sido implicado en la salida de proteínas desde el RE (13). Este receptor llamado Erv14 es una proteína transmembrana politópica que localiza en el RE y reconoce específicamente proteínas con un TMD largo. Por lo tanto, también es posible que exista un receptor que específicamente reconoce hemi-TMDs largos y voluminosos y los incorpora a la vía de endocitosis. Tomando como referencia a Erv14, evaluamos el efecto de la falta de una variedad de proteínas politópicas residentes de la MP que consideramos como posibles candidatas a funcionar como un receptor de nuestros constructos, teniendo en cuenta que la nueva señal de endocitosis que aquí describimos se encuentra en el TMD de las proteínas *cargo*. Partiendo de esta premisa, realizamos una inspección del proteoma de *S. cerevisiae* y generamos una lista de todas las proteínas anotadas como residentes de la MP y las agrupamos según su número de TMDs. Usando esta pequeña base de datos se revisó cada proteína (función asignada, interacciones, etc.) y se eligieron algunas posibles candidatas a funcionar como receptores de endocitosis para proteínas *cargo* con TMDs similares al de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>). Las proteínas candidatas presentan entre 2 y 4 TMDs (el receptor Erv14 tiene 3 TMDs) y la mayoría no posee una función asignada como receptor. Posteriormente se analizó la localización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en cada una de las cepas mutantes del candidato a receptor. En ninguno de los casos estudiados se observó afectada la distribución polarizada de nuestra quimera modelo (Tabla 2).

**Tabla 2**

Proteína candidata	Nº de TMDs	Localización de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )	Proteína candidata	Nº de TMDs	Localización de Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )
Prm8	2		Ina1	3	
Prm9	2		Pga3	3	
Pmp3	2		Rax1	3	
Bud9	2		Ynl194c	4	
Yhl044w	2		Yol019w	4	
Uip3	2		Ygr026w	4	

Bud8	2		Nce102	4	
Lem3	2		Fmp45	4	
Mst27	2		Rim9	4	

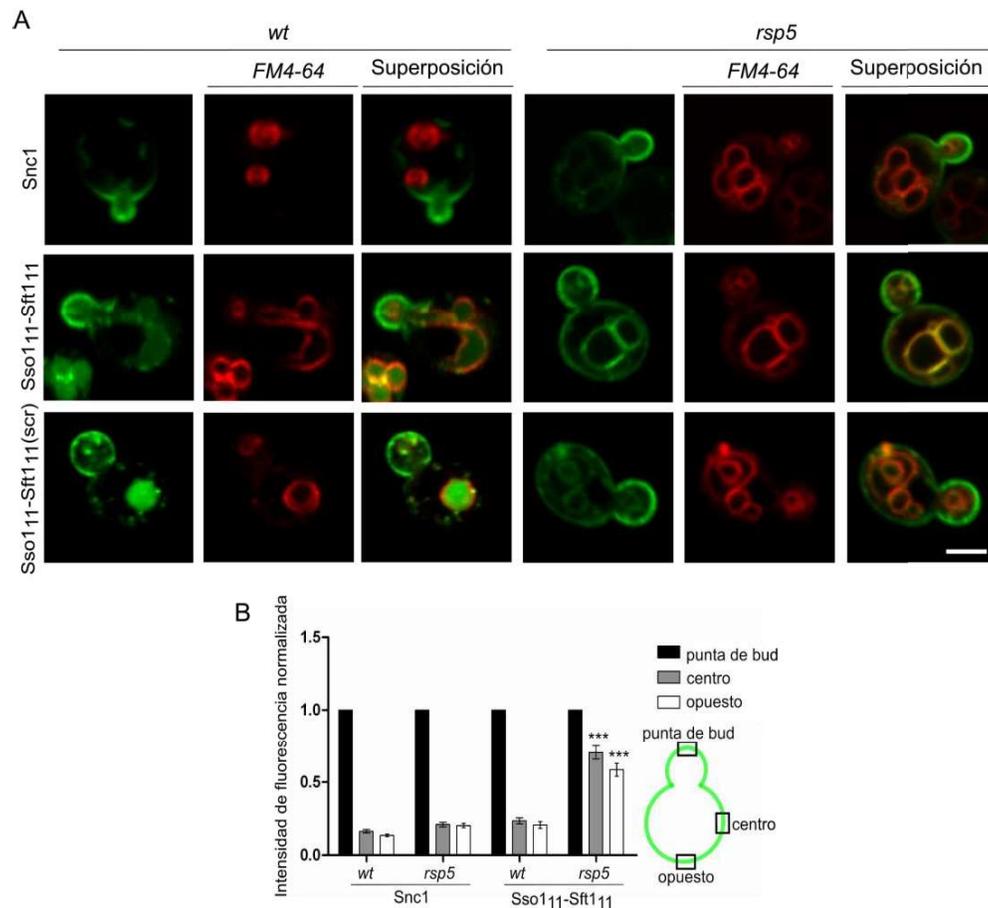
**Tabla 2. Análisis de posibles receptores endocíticos de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>).** Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) fusionada a GFP fue transformada en distintas cepas mutantes de levadura, y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia. En la tabla se informa el nombre de cada proteína candidata, el número de TMDs que presenta y una imagen representativa de la localización de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) en la mutante de delección del gen correspondiente.

Si bien sería posible continuar con un análisis manual escogiendo nuevas posibles candidatas, aplicando nuevas cotas sobre la base de datos generada o generando una nueva, creemos que en este punto sería más conveniente realizar un *screening* sistemático, global y no dirigido, tal como se realizó para la búsqueda de adaptadores de Snc1 (111). Es importante destacar que posiblemente en el reconocimiento de estos TMD para ser internalizados estén involucradas más de una proteína (o ninguna de forma específica).

## Rsp5 afecta la endocitosis de quimeras con un hemi-TMD largo y voluminoso

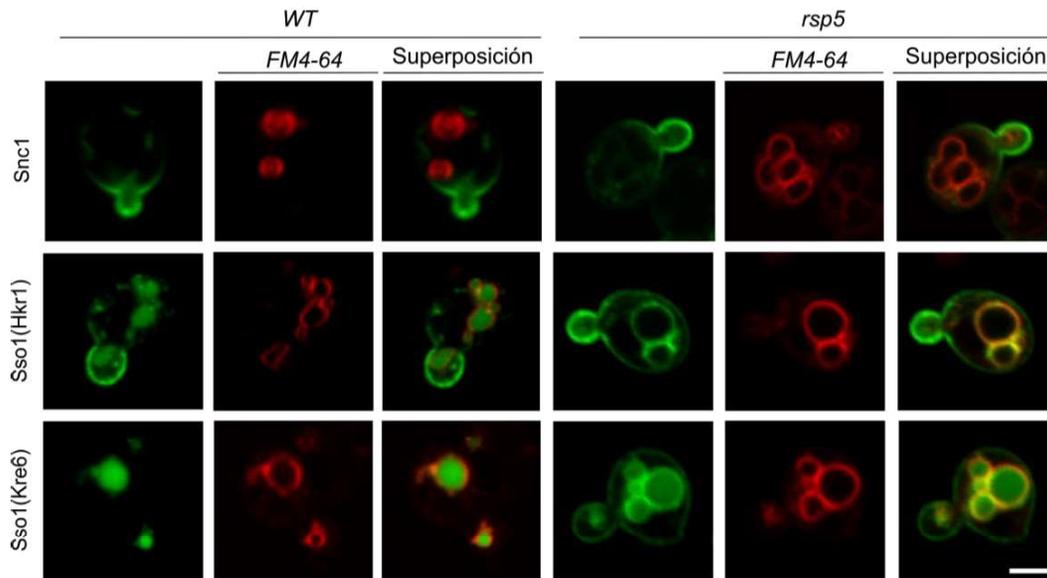
Está bien establecido que muchas proteínas de MP de levadura son modificadas con ubiquitina, lo que resulta en su endocitosis (revisado en (54)). Es así como distintos transportadores son internalizados en respuesta a exceso de sustrato, nutrientes o estrés. En cada uno de los casos evaluados, esta modificación requiere de Rsp5, la ubiquitin ligasa E3 de la familia NEDD4. Como RSP5 es un gen esencial para la viabilidad de la levadura, trabajamos con una cepa mutante (EN44) que posee un alelo hipomórfico (*rsp5*) donde la expresión de Rsp5 resulta disminuida debido al reemplazo del promotor endógeno de RSP5 por un gen de resistencia al antibiótico Nourseotricina (56). Cuando analizamos la localización de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) en la cepa *rsp5* encontramos que su fenotipo de polaridad se ve afectado respecto del observado en una cepa *WT*, mientras que Snc1 permanece completamente polarizada en la mutante (Figura 26A). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia de las imágenes indica que la cantidad de fluorescencia correspondiente a Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) en la MP de la célula madre (centro y opuesto) es prácticamente el doble en la cepa mutante *rsp5* comparado con la salvaje (Figura 26 B). En la mutante *rsp5*, también se observó una pérdida parcial de polaridad de la quimera Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>)scr, que posee alterado aleatoriamente el orden de los aminoácidos que componen el hemi-TMD voluminoso de Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub> (Figura 26A). Esto indica que el efecto de Rsp5

sobre la endocitosis de estas quimeras es independiente de la secuencia primaria de aminoácidos que componen sus TMDs.



**Figura 26. La endocitosis de hemi-TMDs largos y voluminosos es afectada por Rsp5.** **A.** Snc1, Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>)scr fusionadas a GFP (verde) fueron transformadas en cepas *WT* y EN44 (alelo hipomórfico *rsp5*), y observadas por microscopía confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante FM4-64 (rojo) para marcar la membrana vacuolar. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m. **B.** Cuantificación de la polaridad. La intensidad de fluorescencia de Snc1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) en la MP se midió en el extremo de la célula hija (bud), y en el centro y extremo opuesto de la célula madre. Para cada célula la intensidad de fluorescencia fue normalizada al valor de intensidad de la fluorescencia en el bud como se indica en Materiales y Métodos. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M, n=20 células. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza ( $P < 0.05$ ).

Además, analizamos si la falta parcial de Rsp5 afecta la endocitosis de TMDs largos con su mitad exoplásmica voluminosa naturales de *S. cerevisiae*. Para ello, utilizamos las quimeras donde el TMD de Sso1 fue reemplazado por el de las proteínas endógenas Hkr1 o Kre6. En la mutante *rsp5*, también se observó una pérdida parcial de polaridad de la quimera Sso1(Hkr1). Por otro lado, la quimera Sso1(Kre6) puede ser detectada en la MP con una distribución no polarizada, tal como ocurre en la cepa *sla1 $\Delta$* , lo que es indicativo de que la endocitosis de la misma se encuentra disminuida (Figura 27).

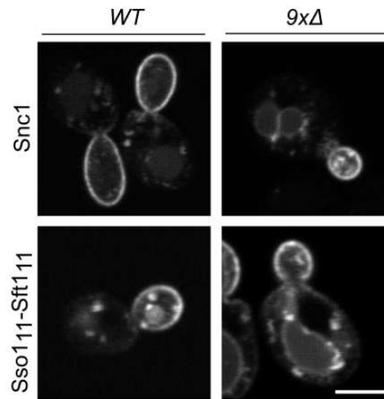


**Figura 27. Rsp5 afecta la polaridad de hemi-TMDs largos y voluminosos endógenos de *S. cerevisiae*.** Snc1, Sso1(Hkr1) y Sso1(Kre6) fusionadas a GFP (verde) fueron transformadas en cepas *WT* y EN44 (alelo hipomórfico *rsp5*), y observadas por microscopía confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante FM4-64 (rojo) para marcar la membrana vacuolar. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

Tanto en la Figura 26 como en la Figura 27 puede observarse que todas las quimeras de Sso1 presentan fluorescencia en el lumen vacuolar en diferente magnitud en una cepa salvaje. En cambio, esta fluorescencia se acumula en la membrana vacuolar en la cepa mutante *rsp5* ya que esta ubiquitin ligasa también es requerida para la degradación vacuolar de numerosas proteínas transmembrana (revisado en (112)).

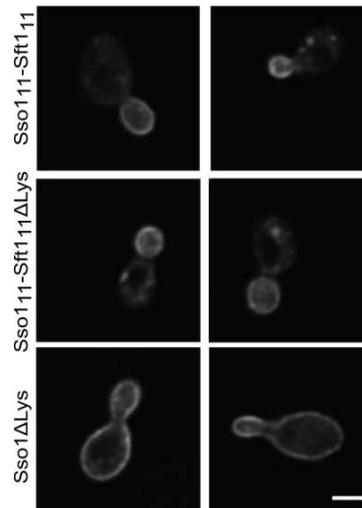
### **El efecto de Rsp5 sobre la polaridad de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es indirecto**

El mecanismo mediante el cual una sola ubiquitin ligasa reconoce una amplia variedad de sustratos comenzó a entenderse hace algunos años cuando diferentes adaptadores de Rsp5 fueron descritos. Rsp5 contiene tres dominios WW que reconocen motivos PY con las secuencias típicas PPXY o LPXY. Se ha demostrado que muchas proteínas que poseen estos motivos PY facilitan la ubiquitinación de proteínas particulares o de grupos de proteínas. Un grupo de adaptadores que ha sido implicado en la endocitosis de proteínas transmembrana es la familia de  $\alpha$ -Arrestinas, que controla los niveles de diferentes transportadores de membrana mediante su interacción con Rsp5 (55,56). Sin embargo, el análisis de una cepa mutante que carece de 9 adaptadores de tipo arrestina (*art(1-8)* $\Delta$ ,*art10* $\Delta$ ) mostró que la polaridad de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no se ve afectada en ausencia de estos adaptadores conocidos (Figura 28).



**Figura 28. La familia de adaptadores  $\alpha$ -Arrestinas no afecta la polaridad de hemi-TMDs largos y voluminosos.** Snc1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) fusionadas a GFP fueron transformadas en cepas WT y EN60 (9x $\Delta$  (*art(1-8)* $\Delta$ ,*art10* $\Delta$ )), y observadas por microscopía confocal. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

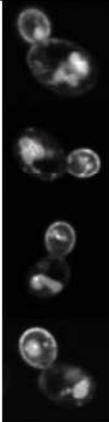
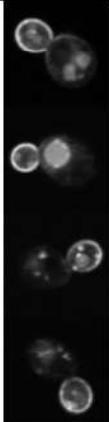
La ubiquitinación consiste en la adición de moléculas de ubiquitina a la proteína blanco en residuos de lisina. Con el objetivo de probar si la endocitosis de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) es el resultado de la ubiquitinación de esta proteína *cargo*, mediada por la enzima Rsp5, generamos versiones mutantes de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) que no puedan ser ubiquitinadas a las se las llamó “ $\Delta$ lys”. El dominio citoplásmico de Sso1 posee en total 17 residuos de lisina. Para mutar cada uno de estos residuos diseñamos genes sintéticos donde se reemplazaron todos los residuos de lisina por residuos de arginina. A estas nuevas mutantes Sso1  $\Delta$ lys y Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) $\Delta$ lys se las expresó fusionadas a un epítipo de 6xHis ya que proteínas fluorescentes comúnmente utilizadas poseen residuos de lisina que podrían ser sustrato de ubiquitinación. En caso de que la ubiquitinación de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) sea un requerimiento para su internalización, la mutante  $\Delta$ lys debería ver comprometida su endocitosis y presentar una distribución homogénea en la MP. En la Figura 29 se muestra el resultado de inmunofluorescencias observadas por microscopía confocal de una cepa de levadura salvaje transformada con las mutantes indicadas. Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) $\Delta$ lys se encuentra completamente polarizada mientras Sso1 $\Delta$ lys se mantiene distribuida homogéneamente en la MP indicando que el efecto de Rsp5 sobre la endocitosis de la quimera con el hemi-TMD largo y voluminoso no está relacionado de forma directa con la modificación de la proteína *cargo*.



**Figura 29. El efecto de Rsp5 sobre la polaridad de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) es indirecto.** Versiones mutantes de Sso1 and Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) donde fueron reemplazados todos los residuos de lisina ( $\Delta$ Lys), fusionadas a un epítipo de 6xHis en su extremo N-terminal, fueron transformadas en cepas *WT* de levadura y observadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Barra de tamaño corresponde a 2  $\mu$ m.

Es posible que alguna otra proteína que interacciona con o sea modificada por Rsp5 sea la responsable de la endocitosis de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>). Con el objetivo de identificar alguna nueva proteína que interacciona con Rsp5 o sea modificada por esta enzima y tenga alguna implicancia en la endocitosis de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) nos valimos de dos *screenings* globales realizados por Gupta, Hesselberth y colaboradores (113,114) que recopilan todas las proteínas de levadura que interactúan con motivos WW y proteínas sustrato de Rsp5. Unificando lo datos de ambos trabajos se generó manualmente una lista de 172 proteínas que poseen motivos de interacción con Rsp5 y/o que son sustrato de la misma. Así mismo, corroboramos la localización subcelular y función asignada de cada una de las proteínas por comparación de las bases de datos *Uniprot* y *Saccharomyces Genome Database*. De la base de datos generada, 91 proteínas están anotadas como citosólicas, solo 8 estarían asociadas a la MP y/o endosomas y 73 a otras organelas (núcleo, mitocondria, etc.). Como principales candidatas se eligieron aquellas proteínas que localizan en MP u organelas de la vía endocítica que se enlistan en la Tabla 3. Se expresó y analizó la localización de Sso1(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) en mutantes de delección de cada uno de los genes que codifican para las proteínas candidatas. En ninguna de las mutantes analizadas se observó pérdida del fenotipo de polaridad por lo que descartamos que alguna de estas proteínas esté involucrada de forma directa en la endocitosis de nuestra quimera modelo.

**Tabla 3**

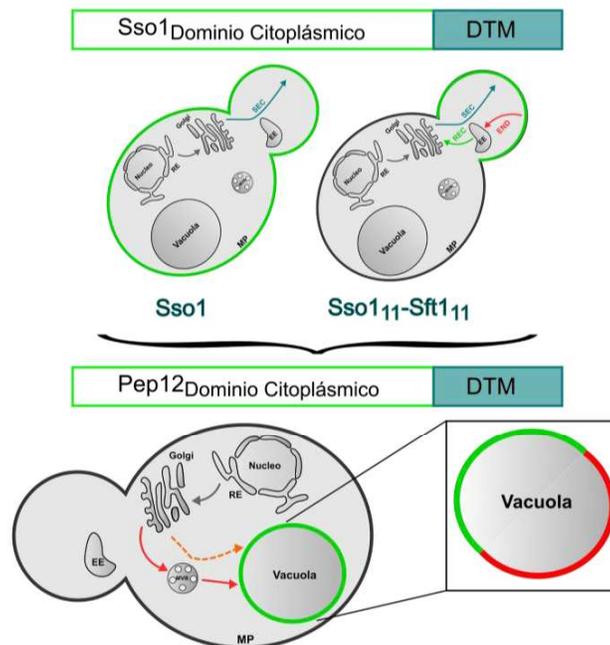
Proteína Candidata	Localización subcelular	Localización de (Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )	Proteína Candidata	Localización subcelular	Localización de (Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )
Ydl012c	MP		Tda3	Endosomas	
Tre1	MP		Sna3	Endosomas	
Sip2	MP		Bro1	Endosomas	
Rcr2	MP/ Endosomas		Ast2	Asociada a MP	

**Tabla 3. Análisis de posibles adaptadores de Rsp5 para Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>).** Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionada a GFP fue transformada en distintas cepas mutantes de levadura y observada bajo microscopio confocal de fluorescencia. En la tabla se informa el nombre de cada proteína candidata, su localización subcelular y una imagen representativa de la localización de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) en la mutante de delección del gen correspondiente.

Nuevamente, creemos que la mejor alternativa en este punto sería realizar un *screening* sistemático, global y no dirigido, tal como se realizó para la búsqueda de adaptadores de Snc1 (111). Este análisis nos permitiría ver el efecto de la delección de cada uno de los genes (para las cepas viables) así como de mutantes dobles. Sin embargo, estos estudios escapan a los fines de esta Tesis.

## II.B EL VOLUMEN DEL HEMI-DOMINIO TRANSMEMBRANA EXOPLÁSMICO PUEDE DIRIGIR LA PARTICIÓN A DIFERENTES DOMINIOS DE MEMBRANA *in vivo*

Una posibilidad interesante es que hemi-TMDs exoplásmicos largos y voluminosos dirijan la internalización de proteínas mediante segregación de las mismas en sub-dominios específicos de la MP que sean más activos en endocitosis. El principal inconveniente para evaluar esta posibilidad *in vivo* es que Sso1 y la proteína quimérica Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) presentan distinta distribución en la MP (además de que Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) también localiza en organelas intracelulares) sumado a las limitaciones técnicas que requiere la visualización de dominios en la MP de levadura. Por esta razón, diseñamos una estrategia experimental en la cual se generaron nuevas proteínas quiméricas mediante el reemplazo del dominio citoplásmico de Sso1 por el equivalente de la SNARE endosomal/vacuolar Pep12. Ésta es una SNARE transmembrana tipo II cuyo dominio citoplásmico sirve como una señal capaz de relocalizar distintas SNAREs a la membrana vacuolar (93). De la misma forma, dicha señal fue capaz de sobrepasar la señal de localización presente en los TMDs (largo y volumen), haciendo posible comparar TMDs con distinta geometría en la misma organela (ver Figura 30).



**Figura 30. Estrategia experimental para evaluar la influencia de la geometría del TMD en la partición a dominios de membrana *in vivo*.** El dominio citoplásmico de Sso1 fue reemplazado por el equivalente de la SNARE Pep12 con el objetivo de que el mismo actúe como una señal de localización vacuolar. En caso de que las nuevas proteínas quiméricas localicen en la membrana vacuolar se induce la formación de microdominios mediante el agregado de acetato de sodio pH 5,2 al medio de cultivo.

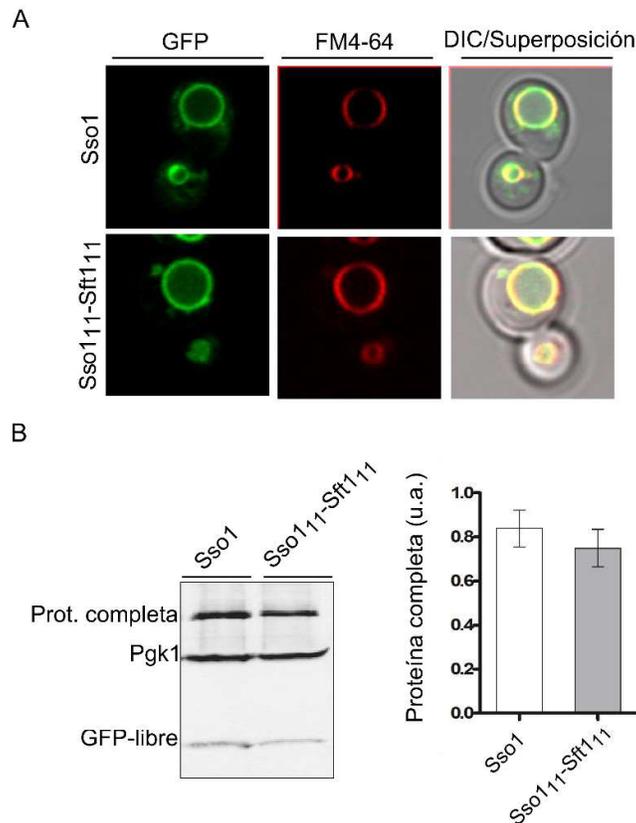
¿Por qué elegimos la membrana vacuolar? Como se mencionó anteriormente, en la membrana de la vacuola es posible inducir la formación de dominios estables y de tamaño micrométrico, lo que

facilita su visualización mediante microscopía confocal de fluorescencia. Estos dominios fueron descritos y caracterizados por Toulmay y Prinz en el año 2013 (88) ellos mostraron que los dominios se forman debido a la falta de nutrientes e inanición de las células, pero también es posible inducir la formación de los mismos bajo distintas condiciones de estrés, entre ellas la acidificación del medio de cultivo como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Como proteína modelo de segregación en dominios vacuolares se utiliza comúnmente una proteína con múltiples pasos transmembrana llamada Vph1 que particiona a dominios con características de fase líquido desordenada (*ld*) (88).

Como se mencionó brevemente antes, se ha demostrado en trabajos previos de nuestro laboratorio que la geometría del TMD, también funciona como un determinante de tráfico a nivel del aparato del Golgi (17). Específicamente, TMDs cortos con la mitad exoplásmica compuesta por aminoácidos voluminosos funcionan como una señal de retención en el Golgi, mientras TMDs cortos, pero poco voluminosos localizan a la MP. Una de las hipótesis acerca del mecanismo por el cual la presencia de aminoácidos voluminosos en el hemi-TMD exoplásmico pueden mediar exportación o retención en el Golgi también está relacionada con una posible afinidad diferencial de estos TMDs por dominios lipídicos. Las vesículas que salen del Golgi hacia la MP están enriquecidas en lípidos de fase ordenada como colesterol y esfingolípidos, mientras que las vesículas COPI poseen concentraciones menores de estos lípidos que el Golgi (34). Por lo que, la membrana del Golgi podría poseer microdominios con concentraciones locales altas de ciertos lípidos y proteínas, y de esto depender la selección de un dado TMD para ser transportado a la MP o no. Para analizar si la partición a dominios lipídicos subyace al evento de *sorting* en el aparato de Golgi, en éste capítulo también realizamos ensayos de visualización de dominios en la membrana vacuolar utilizando proteínas quiméricas del dominio citoplásmico de Pep12 fusionado a TMDs cortos que presentan un hemi-TMD voluminoso o poco voluminoso.

### **El dominio citoplásmico de Pep12 puede relocalizar TMDs largos a la membrana vacuolar**

Se generaron vectores de expresión de las proteínas quiméricas Pep12(Sso1) y Pep12(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a GFP. Usando microscopía confocal determinamos que ambas proteínas quiméricas, localizan en la membrana vacuolar (Figura 31A). Esta localización fue establecida mediante tinción de la membrana de las vacuolas con FM4-64. Los niveles de fluorescencia en el lumen vacuolar son relativamente bajos lo que indica que los constructos no son activamente degradados. Los niveles de expresión de las quimeras fueron evaluados mediante ensayos de *Western blot*. Como se muestra en la Figura 31B, los niveles de expresión de ambas quimeras son similares y además se observan bajos niveles de GFP libre, lo que se condice con lo observado por microscopía. Estos resultados indican que, efectivamente, la señal de localización vacuolar presente en el dominio citoplásmico de la SNARE Pep12 es capaz de sobrepasar la señal de localización en MP dada por la geometría de los TMDs re-localizando a los mismos a la membrana de la vacuola.

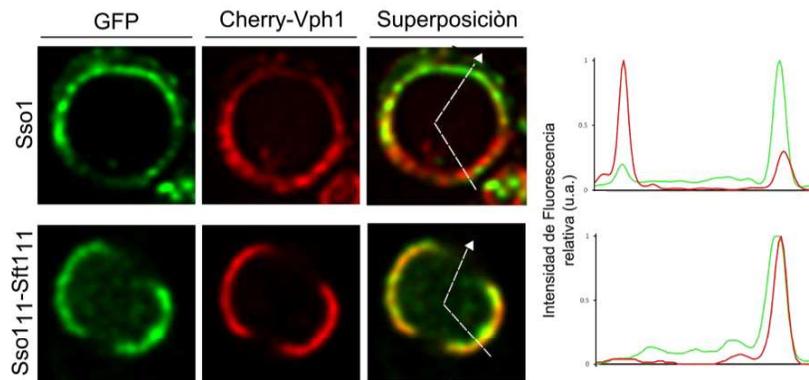


**Figura 31. El dominio citoplásmico de Pep12 re-localiza a los TMDs de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) a la membrana vacuolar.** **A.** Las quimeras Pep12(Sso1) y Pep12(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) fusionadas a GFP (verde) fueron expresadas en cepas de levadura *WT* y observadas bajo microscopio confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante FM4-64 (rojo) para marcar la membrana vacuolar. **B.** El nivel de expresión las proteínas fusionadas a GFP fue analizado mediante ensayos *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP (panel izquierdo). Pgk1 se usó como control de carga. En el panel derecho se muestra la cuantificación de tres experimentos independientes. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M.

### **Pep12(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) se segrega a un dominio diferente al de Pep12(Sso1)**

Con el objetivo de evaluar cómo las dos quimeras, que únicamente difieren en el volumen promedio de su hemi-TMD exoplásmico, particionan a dominios lipídicos expresamos ambas construcciones en una cepa *WT* cuyo genoma fue modificado para expresar de forma estable la proteína vacuolar Vph1 fusionada a la proteína fluorescente roja Cherry. La formación de micro-dominios se indujo por acidificación del medio de cultivo tal como se indica en Materiales y Métodos. Como se muestra en la Figura 32, mientras Pep12(Sso1) particiona a un dominio diferente al marcado con Vph1-Cherry, Pep12(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) segrega al mismo dominio que el marcador. Esto nos indica que, para

estos dos TMDs particulares, una diferencia en el volumen de su mitad exoplásmica es suficiente para dirigir la segregación de los mismos a dominios de membrana de distinto orden.

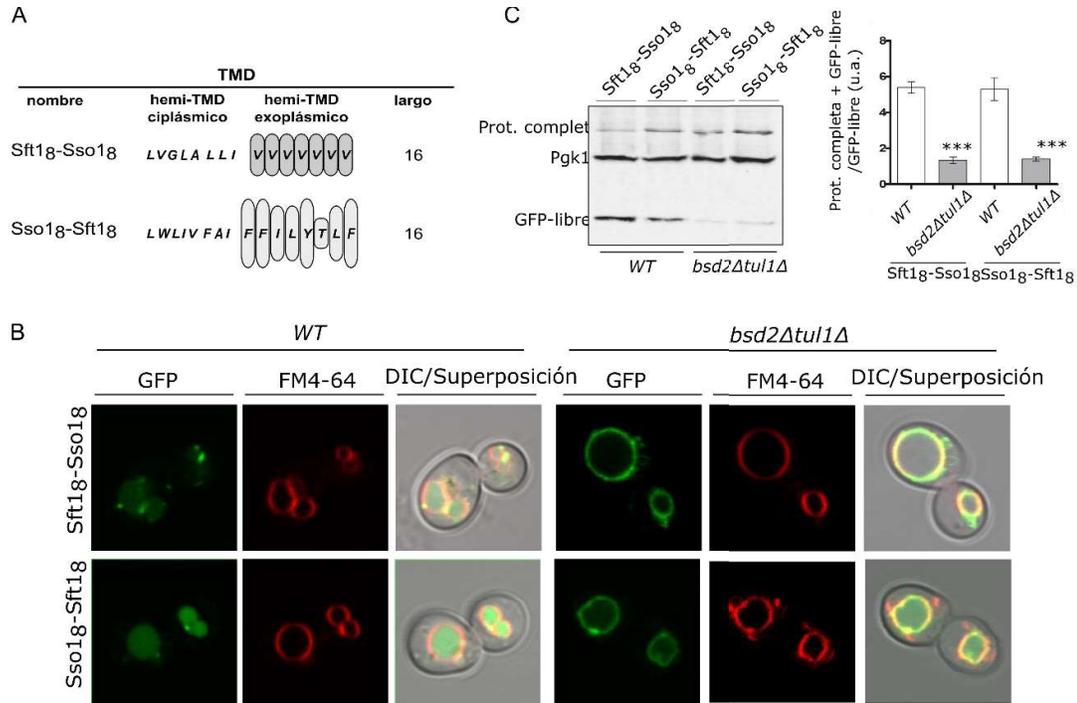


**Figura 32. Pep12(Sso1) y Pep12(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) particionan a dominios diferentes en la membrana vacuolar. A.** Las quimeras Pep12(Sso1) y Pep12(Sso1<sub>111</sub>-Sft1<sub>111</sub>) fusionadas a GFP (verde) fueron expresadas en cepas de levadura *WT* y observadas bajo microscopio confocal. Las células también expresan endógenamente la proteína Vph1-Cherry (rojo) para marcar dominios de membrana con características de *ld*. La formación de microdominios se indujo agregando de 20mM NaOAc pH 5,2 al medio de cultivo. Los gráficos indican la intensidad de fluorescencia medida a lo largo del trayecto indicado por la flecha punteada. Cada valor de intensidad a lo largo del trayecto marcado fue normalizado respecto del valor máximo medido.

### **Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) particionan al mismo microdominio**

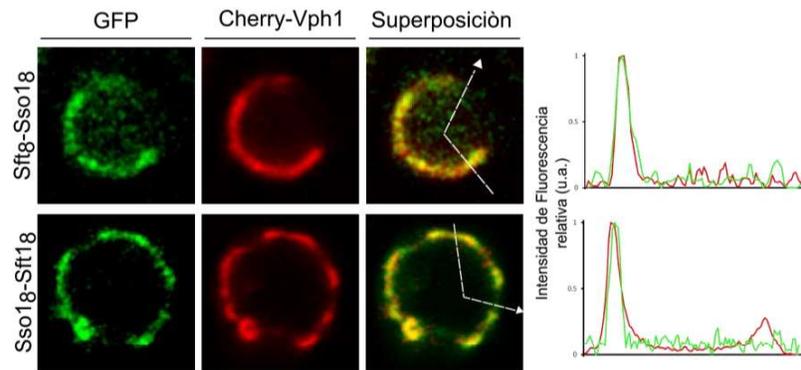
Como se mencionó anteriormente, previo al inicio de este trabajo de tesis, experimentos *in silico* e *in vivo* realizados en nuestro laboratorio mostraron que para TMDs cortos residuos voluminosos en la mitad exoplásmica resultan en una señal de retención en el Golgi, mientras los TMDs cortos con mitades exoplásmicas poco voluminosas son transportados a la MP. Con el fin de evaluar si el volumen del hemi-TMD exoplásmico también es un determinante de partición para TMDs cortos se generaron construcciones quiméricas de Pep12 donde se reemplazó su TMD por los TMDs quiméricos (Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y (Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) esquematizados en la Figura 33A. Usando microscopía confocal determinamos que ambas proteínas quiméricas, fusionadas a GFP localizan en el lumen vacuolar (Figura 33B) en una cepa salvaje. Esta localización fue establecida mediante tinción de la membrana de las vacuolas con FM4-64 y es indicativa de que posiblemente las proteínas están siendo degradadas ya que como se mencionó anteriormente la GFP es resistente a la degradación vacuolar. Sin embargo, la expresión de Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) en la cepa mutante *bsd2Δtul1Δ*, resulta en una disminución de la degradación de las quimeras y en su localización en la membrana vacuolar (Figura 33B). La localización de éstas construcciones en la cepa *bsd2Δtul1Δ*, indica que a diferencia de lo que ocurre con las quimeras de Pep12 con TMDs largos, los TMDs cortos son reconocidos por la maquinaria

de control de calidad que se encuentra en el aparato de Golgi lo que resulta en su degradación en el lumen de la vacuola. Estos resultados se condicen con los niveles de GFP libre observados mediante ensayos de *Western blot*; en la doble mutante *bsd2Δtul1Δ* el nivel de GFP libre se reduce considerablemente en comparación con la cepa salvaje (Figura 33C). En conjunto, estos resultados indican que, si bien las construcciones con TMDs quiméricos cortos son activamente degradadas, cuando evitamos su degradación el dominio citoplásmico de la SNARE Pep12 es capaz de re-localizar dichos TMDs a la membrana de la vacuola.



**Figura 33. Pep12(Sft18-Sso18) y Pep12(Sso18-Sft18) son degradadas en la vacuola.** **A.** Representación esquemática de los TMDs quiméricos (Sft18-Sso18) y (Sso18-Sft18). El volumen de los aminoácidos en el hemi-TMD exoplásmico está representado por la altura de las celdas. El TMD quimérico está nombrado de acuerdo con el origen de cada hemi-TMD, con subíndices mostrando el número de aminoácidos. **B.** Las quimeras Pep12(Sft18-Sso18) y Pep12(Sso18-Sft18) fusionadas a GFP (verde) fueron expresadas en levaduras *WT* o *bsd2Δtul1Δ* y observadas bajo microscopio confocal. Las células también fueron teñidas con el colorante FM4-64 (rojo) para marcar la membrana vacuolar. **C.** Los niveles de expresión de las proteínas en las distintas cepas fueron analizados mediante ensayos de *Western blot* utilizando el anticuerpo anti-GFP (panel derecho). La degradación fue cuantificada como la relación entre GFP libre (resistente a la proteólisis vacuolar) y el total de proteína marcada con GFP (proteína completa + GFP libre). Pgc1 se usó como control de carga. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  S.E.M.,  $n=3$ . Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando “two-way ANOVA” con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza ( $P<0.05$ ).

Con el objetivo de evaluar cómo las dos quimeras, con TMDs cortos y hemi-TMDs de distinto volumen promedio particionan a dominios de membrana *in vivo* expresamos ambas construcciones en una cepa *tul1Δ* (para evitar parcialmente su degradación) que además expresa de forma estable la proteína vacuolar Vph1 fusionada a la proteína fluorescente roja Cherry. Tal como se hizo anteriormente, la formación de micro-dominios se indujo por acidificación del medio de cultivo. Como se muestra en la Figura 34, Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) particionan al mismo dominio en la membrana vacuolar que Vph1. Esto nos indica que, para estos dos TMDs cortos en particular, una diferencia en el volumen de su mitad exoplásmica no funciona como un determinante suficiente para dirigir la segregación de los mismos a distintos dominios lipídicos de membrana vacuolar.



**Figura 34. Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) particionan al mismo dominio en la membrana vacuolar.** A. Las quimeras Pep12(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) y Pep12(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) fusionadas a GFP (verde) fueron expresadas en cepas *tul1Δ* para evitar parcialmente su degradación y observadas bajo microscopio confocal. Las células también expresan endógenamente la proteína Vph1-Cherry (rojo) para marcar dominios de membrana con características de *ld*. La formación de microdominios se indujo agregando de 20mM NaOAc pH 5,2 al medio de cultivo. Los gráficos indican la intensidad de fluorescencia relativa medida a lo largo del trayecto indicado por la flecha punteada. Cada valor de intensidad a lo largo del trayecto marcado fue normalizado respecto del valor máximo medido.

## II.C DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Con el fin de conocer cómo es el mecanismo por el cual las proteínas con un hemi-TMD largo y voluminoso son endocitadas, primero analizamos el efecto de la falta de una variedad de adaptadores endocíticos conocidos. Sin embargo, no nos fue posible identificar un adaptador que sea específicamente requerido para la internalización de este tipo de proteínas *cargo*. La única proteína que mostró un efecto moderado (pero específico) sobre la endocitosis de *cargos* con hemi-TMDs largos y voluminosos es la ubiquitin ligasa Rsp5. En una cepa mutante que porta un alelo hipomórfico de RSP5 la distribución polarizada de nuestros constructos se ve comprometida en aproximadamente un 50%. Sin embargo, demostramos que el efecto de Rsp5 es indirecto ya que una mutante de la proteína *cargo* Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) que no posee ninguna lisina (y por lo tanto no se puede ubiquitinar) continúa localizando de forma polarizada en la MP. Una disminución general de la velocidad de reciclado resultaría en la localización intracelular de Snc1 y disminución de la polaridad. Por lo que, un efecto general de Rsp5 sobre el transporte endosomal, que afecte la velocidad con la que Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es reciclada a la MP tampoco parece ser el caso, ya que Snc1 se localiza completamente polarizada en la cepa *rsp5*. Esto también indica que Snc1 es eficientemente endocitada en la mutante hipomórfica. Adicionalmente, la quimera Sso1(Kre6) que en una cepa *WT* localiza al lumen vacuolar y está completamente ausente en la MP, puede ser observada en la MP en la cepa mutante *rsp5* tal como ocurre en la cepa *sla1Δ*. Esto sugiere que la endocitosis de este constructo se encuentra disminuida en estas condiciones. Finalmente, no podemos descartar la posibilidad de que la endocitosis de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) es hasta cierto punto independiente de Rsp5. Ya que los experimentos se realizaron en una condición donde la actividad de Rsp5 está disminuida pero no eliminada completamente, no podemos distinguir si la actividad restante de Rsp5 es suficiente para conferir la localización polarizada a Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) o si la polaridad parcial mantenida por nuestros constructos se alcanza por un mecanismo independiente de Rsp5.

La forma en que estos TMDs son reconocidos e incluidos en vesículas endocíticas es interesante ya que la mayoría de los adaptadores endocíticos conocidos son citosólicos o reconocen señales presentes en los dominios citoplásmicos de las proteínas *cargo*. Un receptor que reconoce la geometría del TMD ha sido implicado en la salida de proteínas desde el RE. Por lo tanto, también es posible que exista un receptor que específicamente reconoce hemi-TMDs largos y voluminosos y los incorpora a la vía de endocitosis, quizás de un modo Rsp5 dependiente. En este trabajo de tesis, con el análisis de simples mutantes realizado no nos fue posible identificar una proteína que funcione como receptor específico requerido para la internalización de este tipo de proteínas *cargo*. En este punto seguramente sea necesario realizar un rastreo global de proteínas que afecten la polaridad (y por lo tanto la endocitosis) de Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) que nos permita analizar toda la colección de simples y dobles mutantes de delección viables de levadura.

Como se mencionó anteriormente, una posibilidad interesante es que hemi-TMDs exoplásmicos largos y voluminosos dirijan la internalización de proteínas mediante segregación de las

mismas en sub-dominios específicos de la MP que sean más activos en endocitosis. En la MP de levadura, se ha postulado la existencia de dominios que o bien “protegen” a proteínas de ser internalizadas o son activos en endocitosis; sin embargo, tanto su existencia como sus implicancias funcionales aún son foco de discusión. El sub-dominio de MCC fue propuesto como un sub-dominio inactivo en endocitosis. Luego Brach et al., 2011 confirmó que de hecho este sub-dominio es inactivo tanto en endocitosis como en exocitosis; pero también postulan que la localización de las proteínas en este sub-dominio no las podría “proteger” de ser internalizadas ya que las mismas serían capaces de difundir fuera del MCC (115). También, años previos al inicio de este trabajo de tesis, se mostró la existencia de numerosos dominios coexistentes en la MP de levadura, sin embargo, existen vacíos de conocimiento en cuanto a su naturaleza y función.

Utilizando membranas modelo, se ha demostrado para proteínas SNARE de mamíferos que la corrección o *mismatch* hidrofóbica resultado de la diferencia entre el largo del TMD y el espesor de la bicapa lipídica puede inducir la segregación de las mismas en sub-dominios (116). En nuestros experimentos, el largo de los TMDs (Sso1) y (Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) no varía, por lo que las diferencias observadas sólo se deben a cambios en el volumen de la mitad exoplásmica de los mismos. Sin embargo, no podemos descartar que cambios en el volumen del TMD contribuyan en el desbalance hidrofóbico de forma similar (aunque quizás en menos medida) a lo que ocurre con el largo. Más experimentos en ese sentido deberían llevarse a cabo. Trabajos recientes, realizados utilizando GMPVs (Vesículas Gigantes de Membrana Plasmática) como membranas modelo, han revelado que tanto el largo como el área expuesta de los dominios transmembrana son características críticas que pueden actuar como determinantes de partición (117). Se sabe, de estudios de membranas modelo, que los dominios de tipo balsa lipídica *lo* presentan mayor grosor que los dominios de fase *ld* por lo que proteínas con TMDs más largos teóricamente se “acomodarían” mejor en regiones ordenadas de la membrana. Esto fue probado de forma experimental recientemente usando un set de proteínas con un solo TMD de diferentes largos, y de hecho el largo del TMD resulta correlacionar con el grado de partición a dominios de fase *lo* en GMPVs. El área del TMD accesible al solvente también fue recientemente probada como un factor importante para la segregación de proteínas (117,118). Particularmente, proteínas con área accesible al solvente pequeñas prefieren particionar en dominios más ordenados, mientras que la presencia de aminoácidos voluminosos en el TMD interfiere con este proceso. Por otro lado, experimentos realizados por el Dr. Daniel Corona en nuestro laboratorio en colaboración con el Dr. Ernesto Ambroggio (no publicados) utilizando las proteínas Sso1, Sft1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) purificadas y reconstituidas en Vesículas Unilamelares Gigantes (GUVs) como membranas modelo, mostraron que en los tres casos las proteínas tienden a particionar a dominios de fase *ld*. En este trabajo de tesis, nosotros mostramos mediante visualización de microdominios *in vivo* en la membrana vacuolar que, para TMDs largos, una diferencia en el volumen de su mitad exoplásmica es suficiente para dirigir la segregación de los mismos a dominios de distinto orden. Mientras el TMD con la mitad exoplásmica poco voluminosa particiona a un dominio *lo*, aquel con la mitad más voluminosa segrega al dominio de fase *ld*. En conjunto, esto nos indica que existen diferencias en cuanto al comportamiento observado dependiendo del sistema estudiado. Particularmente creemos que nuestro sistema cuenta con la ventaja de tratarse de una

membrana biológica con prácticamente su composición natural en el entorno celular. Por otro lado, al no observar diferencias en cuanto a la partición a sub-dominios para los TMDs cortos sin importar el volumen de su hemi-TMD exoplásmico podríamos inferir que la segregación en sub-dominios de membrana de distinto orden tendría un rol más significativo en el *sorting* de proteínas a nivel de la MP, que en el aparato de Golgi. Sin embargo, es posible que la composición lipídica y proteica de la membrana de cada organela (vacuola, Golgi y MP) aporte condiciones particulares a cada una, por lo que hacer extrapolaciones directas de lo que ocurre en cada una de ellas resulta difícil.

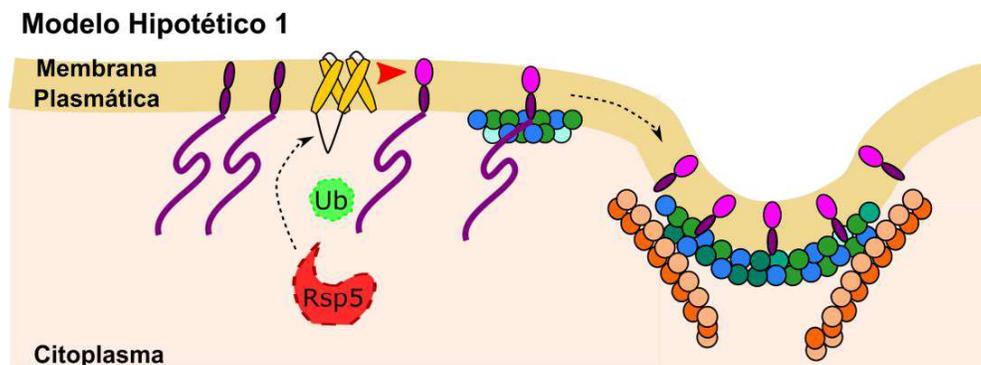
Finalmente, otra hipótesis interesante es que la geometría, tanto el largo del TMD como el volumen de los hemi-TMDs exoplásmicos, favorezcan o no la segregación de las proteínas en regiones de la membrana de diferente curvatura. Se ha propuesto que estas regiones estarían involucradas en eventos numerosos y continuos de fusión y fisión (119), produciendo dominios membranosos altamente curvados y dinámicos, que facilitarían la concentración de ciertos lípidos y proteínas y la segregación de otros. Experimentos en GUVs mostraron que la curvatura de membranas generaría concentraciones diferenciales de lípidos (120) y recientemente se ha demostrado que proteínas *cargo* transmembrana al ser palmitoiladas se concentran en regiones altamente curvadas del Golgi asociadas a la formación de vesículas con destino a la MP (121). De esta forma, por ejemplo, proteínas con diferentes TMDs podrían concentrarse o ser excluidas de regiones altamente curvadas a partir de donde se generan las vesículas de transporte.

# CONCLUSIÓN

---

En este trabajo de tesis demostramos que la geometría del TMD puede actuar como un determinante de transporte a nivel de la MP. Particularmente, un TMD largo con una mitad exoplásmica conformada por aminoácidos voluminosos resulta en una señal de endocitosis funcional, tanto en levaduras como en células de mamíferos. Cabe destacar que hasta el momento todas las señales de endocitosis descritas para proteínas transmembrana se encuentran presentes en sus dominios citoplásmicos, siendo esta la primera señal presente en el TMD. Además, la señal aquí descrita, a diferencia de las principales señales canónicas, está dada por una geometría particular y no por una secuencia primaria de aminoácidos. Estos resultados fueron obtenidos utilizando el TMD quimérico (Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) y fueron luego validados utilizando los TMDs de las proteínas endógenas de *S. cerevisiae* Hkr1 y Kre6.

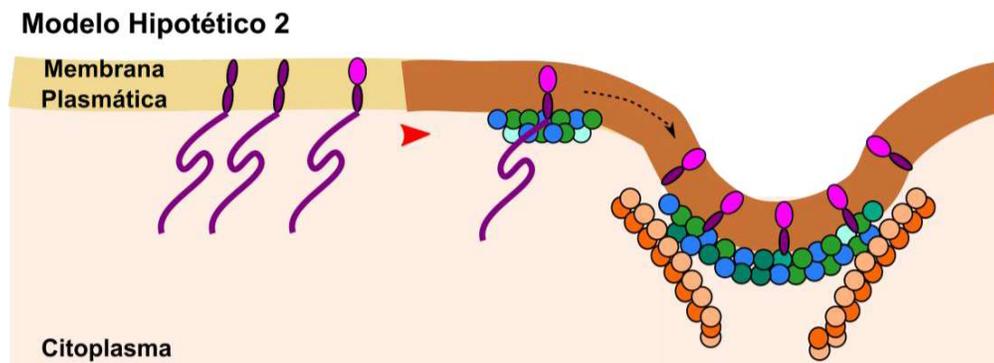
Si bien no fue posible obtener una idea certera acerca de cuál es el mecanismo por el cual estos hemi-TMDs largos y voluminosos son endocitados, la ubiquitin ligasa Rsp5 mostró un efecto moderado (pero específico) sobre la internalización de dichas proteínas *cargo*. Sin embargo, demostramos que el efecto de Rsp5 es indirecto ya que una mutante de Sso1 (Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) que no posee ningún residuo de lisina (y por lo tanto no se puede ubiquitinar) continúa localizando de forma polarizada en la MP. Como se esquematiza en el **Modelo Hipotético 1**, aunque no nos fue posible identificar un adaptador que sea específicamente requerido para la internalización de este tipo de proteínas *cargo*, es posible que existe una proteína que específicamente reconozca este tipo de TMDs y dirija su inclusión en la vía endocítica en un modo dependiente de la actividad de Rsp5. Cabe recordar que un receptor transmembrana que reconoce una geometría particular de TMD ha sido implicado en la salida del RE.



**Figura 35. Modelo Hipotético 1.** En este modelo propuesto, TMDs largos con la mitad exoplásmica voluminosa  son reconocidos por un tipo de receptor  que es capaz de censar específicamente la geometría del hemi-TMD. La actividad de este receptor es dependiente su estado de ubiquitinación, modificación llevada a cabo por Rsp5. Una vez reconocidos en por este hipotético receptor, las proteínas *cargo* son incluidas en vesículas endocíticas e internalizadas.

La re-localización de TMDs largos a la membrana vacuolar, nos permitió mostrar que una diferencia en el volumen de su mitad exoplásmica es suficiente para dirigir la segregación de los mismos a dominios de membrana de distinto orden. Por ello, otra posibilidad interesante, esquematizada en el **Modelo Hipotético 2**, es que hemi-TMDs exoplásmicos largos y voluminosos dirijan la

internalización de proteínas mediante segregación de las mismas en sub-dominios específicos de la MP que sean más activos en endocitosis. De esta forma los TMDs endógenos de Hkr1 y Kre6 podrían particionar a dichos dominios lipídicos; más experimentos en este sentido deberían llevarse a cabo. Como se mencionó anteriormente, en la MP de levadura, se ha postulado la existencia de dominios que o bien “protegen” a proteínas de ser internalizadas o son activos en endocitosis; sin embargo, tanto su existencia como sus implicancias funcionales aún resultan controversiales. Cabe destacar que, aunque se presentan por separado, es posible que ambos mecanismos actúen de manera coordinada y/o en paralelo.



**Figura 35. Modelo Hipotético 2.** En este modelo propuesto, TMDs largos con la mitad exoplásmica voluminosa  particionan a dominios de la MP más activos en endocitosis , de esta forma las proteínas *cargo* resultan incluidas en vesículas endocíticas para ser internalizadas.

Finalmente, mostramos que un hemi-TMD exoplásmico largo y voluminoso es funcional como una señal de endocitosis también en células de mamífero, lo que sugiere que ésta podría tratarse de una señal de endocitosis conservada. El análisis bioinformático de proteínas de membrana de organismos eucariotas superiores con un solo paso transmembrana y anotadas como residentes de MP indica que más del 14% de las mismas posee un TMD relativamente largo con un hemi-TMD exoplásmico voluminoso.

La identificación de este novedoso determinante de endocitosis dado por la geometría del TMD muestra una nueva forma mediante la cual las proteínas *cargo* pueden ser reconocidas e incluidas en la vía endocítica. La misma se basa en un principio fundamental diferente de las señales endocíticas previamente conocidas y, por lo tanto, agrega nuevas perspectivas sobre el mecanismo de endocitosis. Finalmente, la idea de que tanto el volumen como el largo de un TMD determinan la clasificación de proteínas no solo en el Golgi y el RE sino también a nivel de la MP, sugiere que este es un mecanismo de clasificación general que opera en varios pasos de transporte en la célula.

Como parte de este trabajo de Tesis se publicó el siguiente artículo de investigación:

- **“Transmembrane-domain shape is a novel endocytosis and polarity signal for single-spanning membrane proteins in yeast”**

Ayelén González Montoro<sup>1,2\*</sup>, Gonzalo Bigliani<sup>1\*</sup> and Javier Valdez Taubas<sup>1</sup>

**\* Contribución Equivalente**

J Cell Sci. 2017 Nov 15;130(22):3829-3838. doi: 10.1242/jcs.202937. Epub 2017 Oct 2.

Y se encuentra en preparación el siguiente manuscrito:

- **“Transmembrane-domain dictate partition into different lipid domain *in vivo*”**

Gonzalo Bigliani and Javier Valdez Taubas

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Las cepas utilizadas en este trabajo son la BY4741 de genotipo salvaje del consorcio EUROSCARF o mutantes con deleciones completas de cada uno de los genes estudiados marcadas con el casete de resistencia a G418 KanMX del mismo consorcio.

Las cepas *sla1Δ* y *ric1Δ* han sido descrita previamente en (50). Las cepas *bsd2Δ*, *tul1Δ* y *bsd2Δ tul1Δ* han sido descrita previamente en (105).

La cepa *yap1801Δ yap1802Δ* fue cedida amablemente por la Dra. Elizabeth Conibear. Las cepas EN44 (*rsp5*) y EN60 (*9xA (art(1-8)Δ, art10Δ)*) fueron cedidas amablemente por el laboratorio del Dr. Hugh Pelham. Descritas en (55,56) (Nikko y Pelham 2009; Nikko et al. 2008).

Para la generación de dominios en membrana vacuolar se utilizó la cepa SEY6210 de fenotipo salvaje o *tul1Δ* sobre la cual se insertó un casete conteniendo la proteína fluorescente Cherry aguas abajo del inicio del marco abierto de lectura de VPH1 y un gen de resistencia a Higromicina para seleccionar los clones transformantes.

## Construcciones plasmídicas

### Vectores de expresión de proteínas quiméricas bajo el control de GAL1

En el laboratorio se disponían de vectores de expresión en levadura basados en el vector centromérico prs416, de las proteínas Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>), fusionadas en su extremo N-terminal a un epítipo de c-myc por triplicado y bajo el control del promotor constitutivo de TPI1 y el terminador del gen PEP12. Estos vectores fueron descritos en (17) y nombrados pJV486 y pJV490 respectivamente. En estos vectores la secuencia codificante de las quimeras SNARE se encuentra flanqueada por los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Además, poseen un sitio de corte para *HindIII* al inicio de la secuencia del TMD.

Para generar las quimeras Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft<sub>scr</sub>), Sso1(Hkr1), Sso1(Kre6), Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Mid2<sub>11</sub>) and Sso1(Sso1<sub>11</sub>-HVI<sub>11</sub>) se diseñaron genes sintéticos (GenScript, USA) que contienen 100pb de la secuencia codificante para el dominio citoplásmico de Sso1, a continuación, la secuencia codificante para el TMD elegido y 100pb del terminador de PEP12. Esto permitió introducir las secuencias codificantes para los diferentes TMDs mediante recombinación homóloga en levadura (GAP-repair *in vivo*) reemplazando el TMD de Sso1 del vector pJV486 digerido *EcoRI/HindIII*. Las transformantes positivas fueron seleccionadas por reversión de auxotrofia para Uracilo. Finalmente, los plásmidos fueron recuperados y amplificados en *E. coli*. Todas las construcciones fueron verificadas por secuenciamiento luego de su obtención.

Finalmente, cada una de las quimeras de Sso1(TMD) fueron digeridas *EcoRI/BamHI* y clonadas como una fusión a la proteína fluorescente verde (GFP), bajo el control del promotor inducible por galactosa GAL1, en los mismos sitios del plásmido pJV557.

Para generar el vector de GFP-Snc1 bajo el control del promotor inducible se digirió el fragmento de la proteína de fusión HindIII(romo)/BamHI del vector pJV3 y se clonó en el vector pJV557 SmaI/BamHI.

### **Vectores de expresión HA-Kre6**

Fue amplificado mediante PCR el marco abierto de lectura de KRE6 a partir de ADN genómico purificado de una cepa salvaje de *S. cerevisiae* usando los oligonucleótidos: como cebadores. Dicho fragmento se digirió con las enzimas *BamHI/Sall* y se clonó en el vector pJV98 como fusión a un epítipo de HA.

### **Quimeras mutantes de Lisinas**

Se diseñaron y sintetizaron genes sintéticos (GenScript, USA) de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) donde cada codón codificante para lisina fue reemplazado por un codón codificante para arginina. En cada uno de los genes se incluyó un epítipo de 6xHIS en el extremo N-terminal. Dichos fragmentos de ADN fueron digeridos *NheI/BamHI* y clonados en el vector de levaduras pJV480 bajo el control del promotor de TPII.

### **Quimeras de Pep12**

Para la construcción de estas las quimeras de Pep12 con diferentes TMD, partimos de vectores de expresión disponibles en el laboratorio de las proteínas Sso1, Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>), Sso1(Sso1<sub>8</sub>-Sft1<sub>8</sub>) y Sso1(Sft1<sub>8</sub>-Sso1<sub>8</sub>) fusionadas en su extremo N-terminal a un epítipo de c-myc por triplicado y bajo el control del promotor constitutivo de TPII y el terminador del gen PEP12. Estos vectores fueron descritos en (Quiroga et al., 2013) y nombrados pJV486, pJV487, pJV489 y pJV490 respectivamente. En estos vectores la secuencia codificante de las quimeras SNARE se encuentra flanqueada por los sitios de corte de las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Además, poseen un sitio de corte para *HindIII* al inicio de la secuencia del TMD. Procedimos reemplazando el dominio citoplásmico de Sso1 por el equivalente de Pep12 (amplificado por PCR) usando los sitios de restricción *EcoRI/HindIII*. Luego las nuevas quimeras Pep12(TMD) fueron digeridas *EcoRI/BamHI* y clonadas en los mismos sitios del vector pJV3 para su fusión N-terminal a la GFP bajo el control del promotor constitutivo de TPII.

### **Vectores de expresión en células de mamíferos**

Los vectores de expresión en mamíferos fueron generados la secuencia codificante de Sso1 y Sso1(Sso1<sub>11</sub>-Sft1<sub>11</sub>) *EcoRI/BamHI*, e introduciendo estos fragmentos en el vector pmCherry-C1 o pmGFP-C1 (Clontech). La secuencia de todos los plásmidos fue verificada mediante secuenciación de ADN. Los plásmidos de expresión de YFP-Rab11 y YFP-Rab5 fueron cedidos amablemente por el Dr. José Luis Daniotti (CIQUIBIC-CONICET).

### **Electroforesis de proteínas y Western blot**

Para la preparación de las muestras se utilizaron de partida 4 ODs de células de levadura a una densidad óptica de entre 0,8 y 1 OD/ml. Se agregó TCA (Ácido Tricloro Acético) a una concentración

final de 10% V/V y se incubó a las células por 10 minutos en hielo. Luego se centrifugaron a 10.000g durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células colectadas se resuspendieron en 300  $\mu$ l de TCA 10% V/V y se les agregaron 200  $\mu$ l de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Las células se lisaron mecánicamente por agitación durante 10 minutos a 4°C. Se centrifugó durante 1 minuto a 300g para eliminar las perlas de vidrio y restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó 1 minuto a 16.000g para precipitar las proteínas. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 90  $\mu$ l de buffer de corrida con  $\frac{1}{5}$  de 2-Mercaptoetanol más 10  $\mu$ l de Buffer Tris base 1M.

Para la realización de geles de poliacrilamida en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los extractos proteicos se calentaron a 100° durante tres minutos en presencia de buffer de corrida. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente a 12 V por centímetro hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador y luego se aplicaron 20 V por centímetro hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó de acuerdo a lo descrito por Towbin (Towbin et al., 1979). Se bloqueó la membrana de nitrocelulosa en una solución de leche bovina descremada al 5% en PBS durante 30 minutos a T° ambiente. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se realizó en PBS más leche al 5% durante 1 hora a T° ambiente o durante 16 horas a 4°C. Entre las incubaciones de anticuerpos primarios y secundarios se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS por 5 minutos cada uno. Al finalizar, se realizaron 3 lavados adicionales con PBS y las membranas fueron escaneadas usando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK).

### Anticuerpos utilizados

**Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.** Se indica el antígeno, la especie en la cual fueron producidos, la dilución de trabajo y la marca comercial de los mismos.

Antígeno	Especie	Dilución	Marca comercial
GFP	Ratón	1:1500	Roche Applied Science
Pgk1	Ratón	1:2000	Molecular Probes

### Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados para Western blot están acoplados a fluorescentes con emisión en distintas longitudes de onda en el infrarrojo: IRDye 700 e IRDye 800, ya sea anti IgG de conejo o anti IgG de ratón (LI-COR Biosciences, UK), y fueron usados en una dilución 1:20000. Los Western blot fueron escaneados usando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK). Aquellos utilizados para ensayos de inmunofluorescencia están acoplados a fluorescentes con emisión en distintas longitudes de onda en el infrarrojo: IRDye 700 e IRDye 800, ya sea anti IgG de conejo o anti IgG de ratón (LI-COR Biosciences, UK), y fueron usados en una dilución 1:20000.

### **Cuantificación de Western blots**

Para la cuantificación de bandas de Western blot se empleó el software FIJI-ImageJ. Utilizando ROIs rectangulares del mismo tamaño se cuantificó el área bajo la curva correspondiente a cada histograma generado. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando “two-way ANOVA” con el programa GraphPad Prism 5.00. La significancia (\*) se atribuyó al 95% de nivel de confianza ( $P < 0.05$ ). Para dichos análisis se utilizaron al menos 3 experimentos independientes.

### **Estudios bioinformáticos**

El análisis bioinformático de los TMD de proteínas endógenas de *S. cerevisiae* (Capítulo I) fue realizado en colaboración con la Dra. Ayelén González Montoro. El proteoma de *S. cerevisiae*, colectado desde UniProt (UP000002311), fue cargado en Phobius (Kall et al., 2004) para la predicción dominios con de topología de transmembrana. Se seleccionaron las proteínas con solo un TMD. Los TMDs de proteínas transmembrana predichas como tipo II fueron invertidos para que su orientación coincida topológicamente con las tipo I. El volumen promedio de los aminoácidos que constituyen la mitad exoplásmica de cada TMD fue calculado usando la escala de volumen de aminoácidos TSAJ990102 (Tsai et al., 1999). Cuando el TMD predicho posee un número impar de aminoácidos, el residuo central de TMD se excluyó del promedio. La localización subcelular de cada proteína fue obtenida por comparación de las bases de datos UniProt y SGD y la lista de proteínas cuya localización asignada es la MP fue manualmente curada (Apéndice 2).

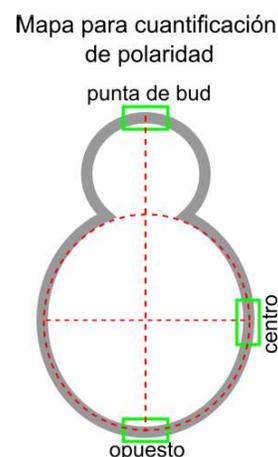
Los conjuntos de proteínas seleccionadas (y mutantes analizadas) en el Capítulo II fueron generados manualmente mediante búsquedas y comparación en las bases de datos SGD y Uniprot. Particularmente para el caso de las proteínas interactuantes o sustrato de Rsp5 se utilizó como partida la base de datos resultado de dos *screenings* realizados por (Gupta et al. 2007; Hesselberth et al. 2006).

### **Microscopía de *S. cerevisiae***

Para observar la localización de proteínas fusionadas a proteínas fluorescentes usando vectores de expresión inducibles por galactosa se crecieron células transformadas con el vector correspondiente en medio mínimo (con la restricción necesaria para la selección del plásmido) durante 18 horas suplementado con 2% de lactato como fuente de carbono. 3 horas previas a su visualización las células fueron centrifugadas 2 minutos a 6200 g para eliminar el medio de cultivo que es reemplazado por medio mínimo con 2% de galactosa. Las células se observaron vivas, luego de ser lavadas con agua estéril, usando microscopio confocal de fluorescencia FV300 o FV1200 equipados con objetivo 60x.

### Cuantificación Polaridad

Como medida de polaridad se cuantificó la intensidad de fluorescencia sobre la MP de las células en una región delimitada por un ROI rectangular del mismo tamaño en distintas zonas de la misma. La MP fue marcada mediante expresión de la proteína Sso1 fusionada a la proteína fluorescente roja mCherry. Como puntos de referencia se eligieron el extremo o punta de la célula hija (punta de bud), el extremo opuesto distal sobre la célula madre (opuesto) y un punto perpendicular al centro de la célula madre (centro) tal como se indica en el esquema. Para cada punto medido (bud, centro y opuesto) el valor de intensidad de fluorescencia se relativizó a la intensidad en la punta del bud para cada una de las células analizadas, tomando como valor = 1 a la relación bud/bud.



### Tinción con FM-464

Se partió de 1 ml de células en fase logarítmica de crecimiento y se centrifugaron 2 minutos a 6.200 g para eliminar el medio de cultivo. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de medio de cultivo con FM4-64 20 $\mu$ M y se incubaron durante 25 minutos a 30°C. Luego se cosecharon las células nuevamente para eliminar el medio con colorante. Se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo y se incubaron nuevamente a 30°C durante 30 minutos. Previo a su visualización las células fueron lavadas 3 veces con 1 ml de agua y finalmente resuspendidas en 100  $\mu$ l de agua.

### Inmunofluorescencia

Se fijaron células de *S. cerevisiae* en estado de crecimiento exponencial, utilizando formaldehído 3.7% durante 45 minutos. Las células fueron esferoplastizadas (digestión de la pared celular) mediante un tratamiento de 15 minutos con DTT, y luego con zymoliasa 0.5  $\mu$ g/ml durante 15 minutos 30°C. Los esferoplastos fueron bloqueados con una solución de albúmina bovina (BSA) al 2% en PBS durante 1 hora a  $^{\circ}$ T ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos fueron realizadas en la misma solución de BSA.

**Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundario utilizados en inmunofluorescencia.** Se indica el antígeno, la especie en la cual fueron producidos, la dilución de trabajo y la marca comercial de los mismos.

Antígeno	Especie	Dilución	Marca comercial
HA	Ratón	1:500	Sigma-Aldrich
6xHIS	Ratón	1:400	Sigma-Aldrich

anti mouse 488	Cabra	1:5000	LI-COR
----------------	-------	--------	--------

## Generación de dominios en membrana vacuolar

Para inducir la formación de microdominios en la membrana vacuolar se crecieron a 30°C y 220 rpm células de levadura transformadas con un vector de expresión de la quimera de interés (selección -URA) y un vector vacío de selección -LEU en medio de cultivo mínimo durante 16 horas hasta su saturación. Se diluyeron los cultivos a una densidad óptica (DO) de 0.15 OD/ml y se los dejó crecer durante aproximadamente 3 o 4 horas hasta alcanzar DO=0,6 DO/ml. En este momento se agregó al medio de cultivo acetato de sodio pH 5,2 a concentración final 60 mM y se continuó con su crecimiento durante 3 horas. Finalmente, las células fueron cosechadas centrifugando por 2 minutos a 6.200 g, resuspendidas en medio de cultivo y observadas bajo microscopio confocal de fluorescencia.

## Microscopía de células CHO-K1

### Cultivo de Células de mamíferos

Células CHO-K1 (A.T.C.C., Manassas, VA, USA) se crecieron y mantuvieron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; Invitrogen) suplementado con 10% V/V con suero fetal bovino y antibióticos. Las transfecciones se realizaron con 1 mg de ADN por placa de 35mm de diámetro usado PEI (polietilenimina) (Sigma-Aldrich). Las células se analizaron fijadas o *in vivo* 16 horas post transfección.

### Microscopía y análisis en células CHO-K1

Las células crecidas sobre vidrios cubreobjetos y transfectadas con los constructos fluorescentes fueron lavadas con buffer PBS y fijadas en paraformaldeido 4% P/V por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego fueron lavadas con buffer PBS y montadas con “FluorSave Reagent” (Calbiochem/EMD Bioscience, MO, USA).

La visualización se realizó con microscopio confocal Olympus FV1200 o FV1000 equipado con objetivo PLAPON 60x SC2 de aceite con apertura numérica 1.4. Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados usando imágenes con *background* descontado con la función de Análisis de Correlación de Fluorescencia de FIJI ImageJ (NIH) con al menos 20 células por cada condición experimental.

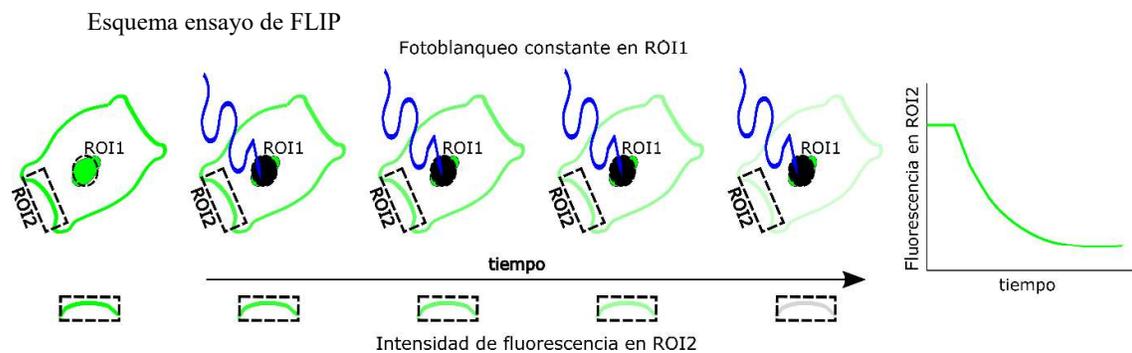
### Endocitosis de Transferrina

Para marcar el endosomas en células CHO-K1, se incubaron las mismas en medio libre de suero por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, 14 µg/ml de Alexa Fluor647-Transferrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fueron adicionados al medio conteniendo 0,1% de BSA, y las células fueron incubadas por 30 minutos. Luego, se analizaron las muestras por microscopía de fluorescencia confocal.

**FLIP (*Fluorescence Loss in Photobleaching*)**

Para los experimentos de FLIP, las células CHO-K1 fueron transfectadas con los constructos fluorescentes e incubadas por 16 horas. Luego, se les adicionó 50 mg/ml de cicloheximida (Sigma-Aldrich) para bloquear la síntesis proteica y se incubaron con Transferrina Alexa-Fluor 647.

Finalmente, las células fueron observadas con microscopio confocal Olympus FV1000 equipado con Zdc automático. Las imágenes pre y post-fotoblanqueo fueron adquiridas usando objetivo PLAPON 63x con apertura numérica de 1.4 cada 6 minutos durante 1 hora excitando con el láser 488. El fotoblanqueo se realizó sobre el endosoma de reciclado delimitado por una región circular de 5 mm de diámetro irradiando con alta intensidad del láser 488. La intensidad promedio de fluorescencia de la MP pre y post-fotoblanqueo fue medida usando el software FIJI ImageJ (NIH). Cada valor fue normalizado a la intensidad de fluorescencia inicial de la MP.



# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Herskowitz I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev.* diciembre de 1988;52(4):536-53.
2. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 Genes. *Science.* 25 de octubre de 1996;274(5287):546-67.
3. Cliften P, Sudarsanam P, Desikan A, Fulton L, Fulton B, Majors J, et al. Finding Functional Features in *Saccharomyces* Genomes by Phylogenetic Footprinting. *Science.* 4 de julio de 2003;301(5629):71-6.
4. Kellis M, Patterson N, Endrizzi M, Birren B, Lander ES. Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements. *Nature.* mayo de 2003;423(6937):241-54.
5. Feyder S, De Craene J-O, Bär S, Bertazzi DL, Friant S. Membrane Trafficking in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Model. *Int J Mol Sci.* enero de 2015;16(1):1509-25.
6. Wallin E, Heijne GV. Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 1998;7(4):1029-38.
7. Walter P, Blobel G. Purification of a membrane-associated protein complex required for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci.* 1 de diciembre de 1980;77(12):7112-6.
8. Walter P, Gilmore R, Blobel G. Protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Cell.* 1 de agosto de 1984;38(1):5-8.
9. Görlich D, Rapoport TA. Protein translocation into proteoliposomes reconstituted from purified components of the endoplasmic reticulum membrane. *Cell.* 19 de noviembre de 1993;75(4):615-30.
10. Palade G. Intracellular Aspects of the Process of Protein Synthesis. *Science.* 1975;189(4200):347-58.
11. Schuldiner M, Metz J, Schmid V, Denic V, Rakwalska M, Schmitt HD, et al. The GET Complex Mediates Insertion of Tail-Anchored Proteins into the ER Membrane. *Cell.* 22 de agosto de 2008;134(4):634-45.
12. Barlowe C. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 1 de junio de 2003;13(6):295-300.
13. Herzig Y, Sharpe HJ, Elbaz Y, Munro S, Schuldiner M. A Systematic Approach to Pair Secretory Cargo Receptors with Their Cargo Suggests a Mechanism for Cargo Selection by Erv14. *PLOS Biol.* 22 de mayo de 2012;10(5):e1001329.
14. Mercanti V, Marchetti A, Lelong E, Perez F, Orci L, Cosson P. Transmembrane domains control exclusion of membrane proteins from clathrin-coated pits. *J Cell Sci.* 1 de octubre de 2010;123(19):3329-35.
15. Montoro AG, Bigliani G, Taubas JV. The shape of the transmembrane domain is a novel endocytosis signal for single-spanning membrane proteins. *J Cell Sci.* 15 de noviembre de 2017;130(22):3829-38.

16. Munro S. An investigation of the role of transmembrane domains in Golgi protein retention. *EMBO J.* 1 de octubre de 1995;14(19):4695-704.
17. Quiroga R, Trenchi A, Montoro AG, Taubas JV, Maccioni HJF. Short transmembrane domains with high-volume exoplasmic halves determine retention of Type II membrane proteins in the Golgi complex. *J Cell Sci.* 1 de diciembre de 2013;126(23):5344-9.
18. Ronchi P, Colombo S, Francolini M, Borgese N. Transmembrane domain-dependent partitioning of membrane proteins within the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 7 de abril de 2008;181(1):105-18.
19. Bonifacino JS, Glick BS. The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. *Cell.* 23 de enero de 2004;116(2):153-66.
20. Giraudo CG, Maccioni HJF. Endoplasmic Reticulum Export of Glycosyltransferases Depends on Interaction of a Cytoplasmic Dibasic Motif with Sar1. *Mol Biol Cell.* 18 de mayo de 2003;14(9):3753-66.
21. Guo Y, Linstedt AD. COPII-Golgi protein interactions regulate COPII coat assembly and Golgi size. *J Cell Biol.* 3 de julio de 2006;174(1):53-63.
22. Quintero CA, Giraudo CG, Villarreal M, Montich G, Maccioni HJF. Identification of a Site in Sar1 Involved in the Interaction with the Cytoplasmic Tail of Glycolipid Glycosyltransferases. *J Biol Chem.* 24 de septiembre de 2010;285(39):30340-6.
23. Tabata KV, Sato K, Ide T, Nishizaka T, Nakano A, Noji H. Visualization of cargo concentration by COPII minimal machinery in a planar lipid membrane. *EMBO J.* 4 de noviembre de 2009;28(21):3279-89.
24. Lee C, Goldberg J. Structure of Coatomer Cage Proteins and the Relationship among COPI, COPII and Clathrin Vesicle Coats. *Cell.* 9 de julio de 2010;142(1):123-32.
25. Nilsson T, Jackson M, Peterson PA. Short cytoplasmic sequences serve as retention signals for transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell.* 25 de agosto de 1989;58(4):707-18.
26. Zerangue N, Schwappach B, Jan YN, Jan LY. A New ER Trafficking Signal Regulates the Subunit Stoichiometry of Plasma Membrane KATP Channels. *Neuron.* 1 de marzo de 1999;22(3):537-48.
27. Michelsen K, Yuan H, Schwappach B. Hide and run. *EMBO Rep.* 1 de agosto de 2005;6(8):717-22.
28. Tu L, Tai WC, Chen L, Banfield DK. Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi. *Science.* 2008;321(5887):404-407.
29. Losev E, Reinke CA, Jellen J, Strongin DE, Bevis BJ, Glick BS. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature.* junio de 2006;441(7096):1002-6.
30. Emr S, Glick BS, Linstedt AD, Lippincott-Schwartz J, Luini A, Malhotra V, et al. Journeys through the Golgi—taking stock in a new era Journeys through the Golgi. *J Cell Biol.* 16 de noviembre de 2009;187(4):449-53.

31. Harsay E, Schekman R. A subset of yeast vacuolar protein sorting mutants is blocked in one branch of the exocytic pathway. *J Cell Biol.* 21 de enero de 2002;156(2):271-86.
32. Kreitzer G, Schmoranzler J, Low SH, Li X, Gan Y, Weimbs T, et al. Three-dimensional analysis of post-Golgi carrier exocytosis in epithelial cells. *Nat Cell Biol.* febrero de 2003;5(2):126-36.
33. Wakana Y, van Galen J, Meissner F, Scarpa M, Polishchuk RS, Mann M, et al. A new class of carriers that transport selective cargo from the trans Golgi network to the cell surface. *EMBO J.* 17 de octubre de 2012;31(20):3976-90.
34. Klemm RW, Ejsing CS, Surma MA, Kaiser H-J, Gerl MJ, Sampaio JL, et al. Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol.* 18 de mayo de 2009;185(4):601-12.
35. Lingwood D, Simons K. Lipid Rafts As a Membrane-Organizing Principle. *Science.* 1 de enero de 2010;327(5961):46-50.
36. Phan H I., Finlay J a., Chu D s., Tan P k., Kirchhausen T, Payne G s. The *Saccharomyces cerevisiae* APS1 gene encodes a homolog of the small subunit of the mammalian clathrin AP-1 complex: evidence for functional interaction with clathrin at the Golgi complex. *EMBO J.* 1 de abril de 1994;13(7):1706-17.
37. Bowers K, Stevens TH. Protein transport from the late Golgi to the vacuole in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 10 de julio de 2005;1744(3):438-54.
38. Peplowska K, Markgraf DF, Ostrowicz CW, Bange G, Ungermann C. The CORVET Tethering Complex Interacts with the Yeast Rab5 Homolog Vps21 and Is Involved in Endo-Lysosomal Biogenesis. *Dev Cell.* 8 de mayo de 2007;12(5):739-50.
39. Cowles CR, Snyder WB, Burd CG, Emr SD. Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J.* 15 de mayo de 1997;16(10):2769-82.
40. Odorizzi G, Cowles CR, Emr SD. The AP-3 complex: a coat of many colours. *Trends Cell Biol.* 1 de diciembre de 1998;8(7):282-8.
41. Kirchhausen T, Owen D, Harrison SC. Molecular Structure, Function, and Dynamics of Clathrin-Mediated Membrane Traffic. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 de mayo de 2014;6(5):a016725-a016725.
42. Prosser DC, Drivas TG, Maldonado-Báez L, Wendland B. Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and forminA clathrin-independent endocytic pathway in yeast. *J Cell Biol.* 14 de noviembre de 2011;195(4):657-71.
43. Lu R, Drubin DG, Sun Y. Clathrin-mediated endocytosis in budding yeast at a glance. *J Cell Sci.* 15 de abril de 2016;129(8):1531-6.
44. Merrifield CJ, Kaksonen M. Endocytic Accessory Factors and Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. noviembre de 2014 [citado 16 de diciembre de 2019];6(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4413230/>

45. Lewis MJ, Nichols BJ, Prescianotto-Baschong C, Riezman H, Pelham HRB. Specific Retrieval of the Exocytic SNARE Snc1p from Early Yeast Endosomes. *Mol Biol Cell*. 1 de enero de 2000;11(1):23-38.
46. Furuta N, Fujimura-Kamada K, Saito K, Yamamoto T, Tanaka K. Endocytic Recycling in Yeast Is Regulated by Putative Phospholipid Translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p Pathway. *Mol Biol Cell*. 8 de noviembre de 2006;18(1):295-312.
47. Wiederkehr A, Avaro S, Prescianotto-Baschong C, Haguenaer-Tsapis R, Riezman H. The F-Box Protein Rcy1p Is Involved in Endocytic Membrane Traffic and Recycling Out of an Early Endosome in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*. 17 de abril de 2000;149(2):397-410.
48. Bretscher M s., Thomson J n. Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells. *EMBO J*. 1 de abril de 1983;2(4):599-603.
49. Pruyne D, Bretscher A. Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci*. 15 de febrero de 2000;113(4):571-85.
50. Valdez-Taubas J, Pelham HRB. Slow Diffusion of Proteins in the Yeast Plasma Membrane Allows Polarity to Be Maintained by Endocytic Cycling. *Curr Biol*. 16 de septiembre de 2003;13(18):1636-40.
51. Hicke L, Riezman H. Ubiquitination of a Yeast Plasma Membrane Receptor Signals Its Ligand-Stimulated Endocytosis. *Cell*. 26 de enero de 1996;84(2):277-87.
52. Haglund K, Dikic I. The role of ubiquitylation in receptor endocytosis and endosomal sorting. *J Cell Sci*. 15 de enero de 2012;125(2):265-75.
53. Traub LM, Lukacs GL. Decoding ubiquitin sorting signals for clathrin-dependent endocytosis by CLASPs. *J Cell Sci*. 15 de febrero de 2007;120(4):543-53.
54. Dupré S, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R. Ubiquitin and endocytic internalization in yeast and animal cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 29 de noviembre de 2004;1695(1):89-111.
55. Nikko E, Pelham HRB. Arrestin-Mediated Endocytosis of Yeast Plasma Membrane Transporters. *Traffic*. 2009;10(12):1856-67.
56. Nikko E, Sullivan JA, Pelham HRB. Arrestin-like proteins mediate ubiquitination and endocytosis of the yeast metal transporter Smf1. *EMBO Rep*. 1 de diciembre de 2008;9(12):1216-21.
57. Dores MR, Schnell JD, Maldonado-Baez L, Wendland B, Hicke L. The Function of Yeast Epsin and Ede1 Ubiquitin-Binding Domains During Receptor Internalization. *Traffic*. 2010;11(1):151-60.
58. Sun Y, Carroll S, Kaksonen M, Toshima JY, Drubin DG. PtdIns(4,5)P2 turnover is required for multiple stages during clathrin- and actin-dependent endocytic internalization. *J Cell Biol*. 23 de abril de 2007;177(2):355-67.
59. Sun Y, Drubin DG. The functions of anionic phospholipids during clathrin-mediated endocytosis site initiation and vesicle formation. *J Cell Sci*. 15 de diciembre de 2012;125(24):6157-65.

60. Zanolari B, Friant S, Funato K, Sütterlin C, Stevenson BJ, Riezman H. Sphingoid base synthesis requirement for endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15 de junio de 2000;19(12):2824-33.
61. Traub LM, Bonifacino JS. Cargo Recognition in Clathrin-Mediated Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. noviembre de 2013 [citado 16 de diciembre de 2019];5(11). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809577/>
62. Collawn JF, Stangel M, Kuhn LA, Esekogwu V, Jing S, Trowbridge IS, et al. Transferrin receptor internalization sequence YXRF implicates a tight turn as the structural recognition motif for endocytosis. *Cell.* 30 de noviembre de 1990;63(5):1061-72.
63. Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem.* 25 de febrero de 1990;265(6):3116-23.
64. Letourneur F, Klausner RD. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell.* 26 de junio de 1992;69(7):1143-57.
65. Pond L, Kuhn LA, Teyton L, Schutze M-P, Tainer JA, Jackson MR, et al. A Role for Acidic Residues in Di-leucine Motif-based Targeting to the Endocytic Pathway. *J Biol Chem.* 25 de agosto de 1995;270(34):19989-97.
66. Pitcher C, Höning S, Fingerhut A, Bowers K, Marsh M. Cluster of Differentiation Antigen 4 (CD4) Endocytosis and Adaptor Complex Binding Require Activation of the CD4 Endocytosis Signal by Serine Phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 1 de marzo de 1999;10(3):677-91.
67. Shiratori T, Miyatake S, Ohno H, Nakaseko C, Isono K, Bonifacino JS, et al. Tyrosine Phosphorylation Controls Internalization of CTLA-4 by Regulating Its Interaction with Clathrin-Associated Adaptor Complex AP-2. *Immunity.* 1 de mayo de 1997;6(5):583-9.
68. Schweizer A, Kornfeld S, Rohrer J. Cysteine34 of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting. *J Cell Biol.* 15 de febrero de 1996;132(4):577-84.
69. Rohrer J, Schweizer A, Russell D, Kornfeld S. The targeting of Lamp1 to lysosomes is dependent on the spacing of its cytoplasmic tail tyrosine sorting motif relative to the membrane. *J Cell Biol.* 15 de febrero de 1996;132(4):565-76.
70. Miller SE, Sahlender DA, Graham SC, Höning S, Robinson MS, Peden AA, et al. The Molecular Basis for the Endocytosis of Small R-SNAREs by the Clathrin Adaptor CALM. *Cell.* 23 de noviembre de 2011;147(5):1118-31.
71. Pryor PR, Jackson L, Gray SR, Edeling MA, Thompson A, Sanderson CM, et al. Molecular Basis for the Sorting of the SNARE VAMP7 into Endocytic Clathrin-Coated Vesicles by the ArfGAP Hrb. *Cell.* 5 de septiembre de 2008;134(5):817-27.
72. Yu A, Xing Y, Harrison SC, Kirchhausen T. Structural Analysis of the Interaction between Dishevelled2 and Clathrin AP-2 Adaptor, A Critical Step in Noncanonical Wnt Signaling. *Structure.* 13 de octubre de 2010;18(10):1311-20.

73. Ferguson SSG, Downey WE, Colapietro A-M, Barak LS, Ménard L, Caron MG. Role of  $\beta$ -Arrestin in Mediating Agonist-Promoted G Protein-Coupled Receptor Internalization. *Science*. 19 de enero de 1996;271(5247):363-6.
74. Fiore PPD, Zastrow M von. *Endocytosis, Signaling, and Beyond*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 8 de enero de 2014;6(8):a016865.
75. Piper RC, Dikic I, Lukacs GL. Ubiquitin-Dependent Sorting in Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 de enero de 2014;6(1):a016808.
76. Kholodenko BN. Cell-signalling dynamics in time and space. *Nat Rev Mol Cell Biol*. marzo de 2006;7(3):165-76.
77. Bernardino de la Serna J, Schütz GJ, Eggeling C, Cebecauer M. There Is No Simple Model of the Plasma Membrane Organization. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016 [citado 17 de diciembre de 2019];4. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2016.00106/full>
78. Kusumi A, Nakada C, Ritchie K, Murase K, Suzuki K, Murakoshi H, et al. Paradigm Shift of the Plasma Membrane Concept from the Two-Dimensional Continuum Fluid to the Partitioned Fluid: High-Speed Single-Molecule Tracking of Membrane Molecules. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2005;34(1):351-78.
79. Sezgin E, Levental I, Mayor S, Eggeling C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*. junio de 2017;18(6):361-74.
80. Sezgin E, Kaiser H-J, Baumgart T, Schwille P, Simons K, Levental I. Elucidating membrane structure and protein behavior using giant plasma membrane vesicles. *Nat Protoc*. junio de 2012;7(6):1042-51.
81. Levental I, Lingwood D, Grzybek M, Coskun Ü, Simons K. Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins. *Proc Natl Acad Sci*. 21 de diciembre de 2010;107(51):22050-4.
82. Sevcsik E, Brameshuber M, Fölser M, Weghuber J, Honigmann A, Schütz GJ. GPI-anchored proteins do not reside in ordered domains in the live cell plasma membrane. *Nat Commun*. 21 de abril de 2015;6(1):1-10.
83. Shogomori H, Hammond AT, Ostermeyer-Fay AG, Barr DJ, Feigenson GW, London E, et al. Palmitoylation and Intracellular Domain Interactions Both Contribute to Raft Targeting of Linker for Activation of T Cells. *J Biol Chem*. 13 de mayo de 2005;280(19):18931-42.
84. Malínská K, Malínský J, Opekarová M, Tanner W. Visualization of Protein Compartmentation within the Plasma Membrane of Living Yeast Cells. *Mol Biol Cell*. 25 de julio de 2003;14(11):4427-36.
85. Berchtold D, Walther TC. TORC2 Plasma Membrane Localization Is Essential for Cell Viability and Restricted to a Distinct Domain. *Mol Biol Cell*. 14 de enero de 2009;20(5):1565-75.
86. Kaksonen M, Toret CP, Drubin DG. A Modular Design for the Clathrin- and Actin-Mediated Endocytosis Machinery. *Cell*. 21 de octubre de 2005;123(2):305-20.

87. Spira F, Mueller NS, Beck G, Olshausen P von, Beig J, Wedlich-Söldner R. Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol.* junio de 2012;14(6):640-8.
88. Toulmay A, Prinz WA. Direct imaging reveals stable, micrometer-scale lipid domains that segregate proteins in live cells. *J Cell Biol.* 8 de julio de 2013;202(1):35-44.
89. Tsuji T, Fujimoto M, Tatematsu T, Cheng J, Orii M, Takatori S, et al. Niemann-Pick type C proteins promote microautophagy by expanding raft-like membrane domains in the yeast vacuole. *eLife* [Internet]. [citado 17 de diciembre de 2019];6. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5462540/>
90. Wang C-W, Miao Y-H, Chang Y-S. A sterol-enriched vacuolar microdomain mediates stationary phase lipophagy in budding yeast. *J Cell Biol.* 4 de agosto de 2014;206(3):357-66.
91. Rayermann SP, Rayermann GE, Cornell CE, Merz AJ, Keller SL. Hallmarks of Reversible Separation of Living, Unperturbed Cell Membranes into Two Liquid Phases. *Biophys J.* 5 de diciembre de 2017;113(11):2425-32.
92. Rayner JC, Pelham HRB. Transmembrane domain-dependent sorting of proteins to the ER and plasma membrane in yeast. *EMBO J.* 15 de abril de 1997;16(8):1832-41.
93. Reggiori F, Black MW, Pelham HRB. Polar Transmembrane Domains Target Proteins to the Interior of the Yeast Vacuole. *Mol Biol Cell.* 1 de noviembre de 2000;11(11):3737-49.
94. Bretscher MS, Munro S. Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science.* 3 de septiembre de 1993;261(5126):1280-1.
95. Dukhovny A, Yaffe Y, Shepshelovitch J, Hirschberg K. The length of cargo-protein transmembrane segments drives secretory transport by facilitating cargo concentration in export domains. *J Cell Sci.* 2009;122(11):1759-67.
96. Sharpe HJ, Stevens TJ, Munro S. A Comprehensive Comparison of Transmembrane Domains Reveals Organelle-Specific Properties. *Cell.* 9 de julio de 2010;142(1):158-69.
97. Aalto M k., Ronne H, Keränen S. Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J.* 1 de noviembre de 1993;12(11):4095-104.
98. Barral Y, Mermall V, Mooseker MS, Snyder M. Compartmentalization of the Cell Cortex by Septins Is Required for Maintenance of Cell Polarity in Yeast. *Mol Cell.* 1 de mayo de 2000;5(5):841-51.
99. Warren DT, Andrews PD, Gourlay CW, Ayscough KR. Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J Cell Sci.* 15 de abril de 2002;115(8):1703-15.
100. Siniosoglou S, Peak-Chew SY, Pelham HRB. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *EMBO J.* 15 de septiembre de 2000;19(18):4885-94.

101. Ketela T, Green R, Bussey H. Saccharomyces cerevisiae Mid2p Is a Potential Cell Wall Stress Sensor and Upstream Activator of the PKC1-MPK1 Cell Integrity Pathway. *J Bacteriol.* junio de 1999;181(11):3330-40.
102. Engelman DM, Steitz TA, Goldman A. Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 1986;15:321-53.
103. Tatebayashi K, Tanaka K, Yang H-Y, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, et al. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* 8 de agosto de 2007;26(15):3521-33.
104. Kurita T, Noda Y, Takagi T, Osumi M, Yoda K. Kre6 Protein Essential for Yeast Cell Wall  $\beta$ -1,6-Glucan Synthesis Accumulates at Sites of Polarized Growth. *J Biol Chem.* 3 de abril de 2011;286(9):7429-38.
105. Hettema EH, Valdez-Taubas J, Pelham HRB. Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins. *EMBO J.* 24 de marzo de 2004;23(6):1279-88.
106. Reggiori F, Pelham HRB. A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat Cell Biol.* febrero de 2002;4(2):117-23.
107. Nikolovski N, Rubtsov D, Segura MP, Miles GP, Stevens TJ, Dunkley TPJ, et al. Putative Glycosyltransferases and Other Plant Golgi Apparatus Proteins Are Revealed by LOPIT Proteomics1[W]. *Plant Physiol.* octubre de 2012;160(2):1037-51.
108. Gomez GA, Daniotti JL. H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment. *J Biol Chem.* 14 de octubre de 2005;280(41):34997-5010.
109. Lippincott-Schwartz J, Snapp E, Kenworthy A. Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* junio de 2001;2(6):444-56.
110. Brach T, Godlee C, Moeller-Hansen I, Boeke D, Kaksonen M. The Initiation of Clathrin-Mediated Endocytosis Is Mechanistically Highly Flexible. *Curr Biol.* 3 de marzo de 2014;24(5):548-54.
111. Burston HE, Maldonado-Báez L, Davey M, Montpetit B, Schluter C, Wendland B, et al. Regulators of yeast endocytosis identified by systematic quantitative analysis. *J Cell Biol.* 15 de junio de 2009;185(6):1097-110.
112. Belgareh-Touzé N, Léon S, Erpapazoglou Z, Stawiecka-Mirota M, Urban-Grimal D, Haguenaer-Tsapis R. Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochem Soc Trans.* octubre de 2008;36(Pt 5):791-6.
113. Gupta R, Kus B, Fladd C, Wasmuth J, Tonikian R, Sidhu S, et al. Ubiquitination screen using protein microarrays for comprehensive identification of Rsp5 substrates in yeast. *Mol Syst Biol.* 1 de enero de 2007;3(1):116.
114. Hesselberth JR, Miller JP, Golob A, Stajich JE, Michaud GA, Fields S. Comparative analysis of Saccharomyces cerevisiae WW domains and their interacting proteins. *Genome Biol.* 10 de abril de 2006;7(4):R30.

115. Brach T, Specht T, Kaksonen M. Reassessment of the role of plasma membrane domains in the regulation of vesicular traffic in yeast. *J Cell Sci.* 1 de febrero de 2011;124(3):328-37.
116. Milovanovic D, Honigmann A, Koike S, Göttfert F, Pähler G, Junius M, et al. Hydrophobic mismatch sorts SNARE proteins into distinct membrane domains. *Nat Commun.* 30 de enero de 2015;6:5984.
117. Lorent JH, Diaz-Rohrer B, Lin X, Spring K, Gorfe AA, Levental KR, et al. Structural determinants and functional consequences of protein affinity for membrane rafts. *Nat Commun.* 31 de octubre de 2017;8(1):1-10.
118. Diaz-Rohrer BB, Levental KR, Simons K, Levental I. Membrane raft association is a determinant of plasma membrane localization. *Proc Natl Acad Sci.* 10 de junio de 2014;111(23):8500-5.
119. Pfeffer SR. How the Golgi works: A cisternal progenitor model. *Proc Natl Acad Sci.* 16 de noviembre de 2010;107(46):19614-8.
120. Sorre B, Callan-Jones A, Manneville J-B, Nassoy P, Joanny J-F, Prost J, et al. Curvature-driven lipid sorting needs proximity to a demixing point and is aided by proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 7 de abril de 2009;106(14):5622-6.
121. Ernst AM, Syed SA, Zaki O, Bottanelli F, Zheng H, Hacke M, et al. S-Palmitoylation Sorts Membrane Cargo for Anterograde Transport in the Golgi. *Dev Cell.* 19 de noviembre de 2018;47(4):479-493.e7.

**APÉNDICE 1:** Tabla de aminoácidos con sus respectivos volúmenes y valores de hidrofobicidad utilizados para los cálculos realizados en este trabajo de tesis.

**Apéndice 1**

Aminoácido	Volumen (A <sup>3</sup> )	Hidrofobicidad (Escala GES)
F	189,9	-3,7
M	162,9	-3,4
I	166,7	-3,1
L	166,7	-2,8
V	140	-2,6
C	108,5	-2
W	227,8	-1,9
A	88,6	-1,6
T	116,1	-1,2
G	60,1	-1
S	89	-0,6
P	112,7	0,2
Y	193,6	0,7
H	153,2	3
Q	143,8	4,1
N	114,1	4,8
E	138,4	8,2
K	168,6	8,8
D	111,1	9,2
R	173,4	12,3

**APÉNDICE 2:** Lista de proteínas transmembrana con un solo paso transmembrana residentes de membrana plasmática de *S. cerevisiae* utilizadas para análisis bioinformático.

**Apéndice 2**

Nombre	Largo	Volumen promedio del hemi-DTM exoplásmico
Sso1(Sso1 <sub>11</sub> -Sft1 <sub>11</sub> )	22	168,30
P32486 KRE6_YEAST	21	155,46
P41809 HKR1_YEAST	23	152,09
P33328 SNC2_YEAST	22	150,54
Q12057 PIN2_YEAST	22	150,45
P53045 ERG25_YEAST	26	146,61
P31109 SNC1_YEAST	21	146,45
P51862 ROM2_YEAST	20	145,60
P08459 SPS2_YEAST	21	145,36
Q8TGN9 NAG1_YEAST	20	143,41
P32903 PMP1_YEAST	22	142,15
P33336 SKN1_YEAST	24	141,94
P40975 PMP2_YEAST	25	139,69
Q02820 NCE1_YEAST	18	139,37
P43561 FET5_YEAST	20	138,09
Q06135 GAS2_YEAST	21	137,56
P39926 SSO2_YEAST	24	135,70
P32867 SSO1_YEAST	22	132,85
Q12465 RAX2_YEAST	28	132,64
P33314 BUD2_YEAST	20	132,35
P11972 SST2_YEAST	19	131,64
P11710 FUS1_YEAST	25	131,01
P40440 YIR1_YEAST	23	130,96
P38993 FET3_YEAST	22	129,73
P32334 MSB2_YEAST	23	127,92
Q08054 CSI2_YEAST	23	122,52
Q12215 WSC3_YEAST	25	122,29
Q06810 OPY2_YEAST	24	122,21
P36027 MID2_YEAST	24	121,80
Q05031 DFG5_YEAST	22	121,58
P53214 MTL1_YEAST	24	119,74
P50078 TOS2_YEAST	26	116,15
P32900 SKG6_YEAST	26	115,86
P38928 AXL2_YEAST	26	113,53
P53832 WSC2_YEAST	26	111,45
P36169 SKG1_YEAST	24	111,19
P36091 DCW1_YEAST	22	109,30
P54867 SLG1_YEAST	26	107,37



Universidad  
Nacional  
de Córdoba

Centro de Investigación en Química Biológica de Córdoba  
(CIQUIBIC-CONICET)

Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba