



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**Análisis de la función de SIm35 durante la autofagia en
*Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSUÉ MIGUEL JULIÁN RAMÍREZ REYES

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARÍA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO
INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO
FACULTAD DE QUÍMICA
DR. CARLOS LEONARDO PERAZA REYES
INSTITUTO DE FISILOGÍA CELULAR

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Reconocimientos

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. María Soledad Funes Argüello en el laboratorio 204 Sur del Departamento de Genética Molecular de la División de Investigación Básica del Instituto de Fisiología Celular (UNAM).

Al comité tutor que asesoró el desarrollo de esta tesis de maestría conformado por la Dra. Sobeida Sánchez Nieto (Facultad de Química-Conjunto E, UNAM) y el Dr. Carlos Leonardo Peraza Reyes (IFC, UNAM).

A la M. en C. Ariann Elizabeth Mendoza Martínez por la ayuda técnica brindada y por su valiosa participación en este trabajo.

Este trabajo constituye parte del proyecto de investigación apoyado por los donativos 237344 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) con números IN202715 e IN207518.

A la Unidad de Imagenología del IFC (UNAM) en particular a la Dra. Ruth Rincón Heredia y al Dr. Abraham Rosas Arellano por el apoyo técnico brindado para el análisis de microscopía realizado en este trabajo.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Biol. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera, miembros de la Unidad de Biología Molecular del IFC (UNAM), por la síntesis de oligonucleótidos y la secuenciación de plásmidos utilizados en este proyecto.

A Gerardo Coello Coutiño, Juan Manuel Barbosa Castillo e Ivette Rosas Arciniega, miembros de la Unidad de Cómputo del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

Al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP) por el apoyo otorgado para asistir al XXXII Congreso Nacional de Bioquímica.

Al Ing. Aurey Gaván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides del Taller de Mantenimiento del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

Al Javier Gallegos Infante y Sandra Moncada Hernández personal de la Biblioteca “Armando Gómez Puyou” del IFC (UNAM), por su ayuda técnica.

A CONACyT por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría con número de registro 620961.

Abreviaturas

Cvt	Transporte Citoplasma a Vacuola
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
PAS	Sitio de ensamblaje del fagóforo
FE	Fosfatidiletanolamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
ATG'X'	Distintos genes relacionados a autofagia
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
VN	Fragmento amino terminal de Venus
VC	Fragmento carboxilo terminal de Venus
GFP	Proteína verde fluorescente
tBOOH	Ter Butil Hidroperóxido

Contenido	
1 Resumen	4
2 Introducción	5
2.1 Autofagia.....	5
2.2 Mitofagia	11
2.3 Función de las proteínas relacionadas con la autofagia	12
2.3.1 Atg32, receptor de mitofagia	12
2.3.1.1 Modificaciones postraduccionales de Atg32	13
2.3.2 Atg33, receptor de mitofagia	14
2.3.3 Atgs involucradas en la formación del fagóforo.....	15
2.3.3.1 Atg1, cinasa del PAS.....	15
2.3.3.2 Atg13, proteína de andamiaje del PAS	16
2.3.3.3 Atg17, formación del PAS y fusión del autofagosoma con la vacuola	17
2.3.4 Atg8 y la expansión de fagóforo	18
2.3.5 Atgs con papeles importantes en la autofagia selectiva	19
2.3.5.1 Atg11, dirigiendo el organelo blanco al PAS	20
2.3.5.2 Atg21, expansión del fagóforo en la autofagia selectiva	20
2.3.5.3 Atg20 y Atg24, involucradas en la formación y expansión del fagóforo	
.....	21
2.4 Respuestas celulares a estrés.....	23
3 Antecedentes directos	25
3.1 SIm35 y su papel en <i>S. cerevisiae</i>	25
4 Planteamiento del problema.....	27
5 Hipótesis.....	27
6 Objetivos	28

6.1	Objetivo general.....	28
6.2	Objetivos particulares	28
7	Materiales y métodos	29
7.1	Mutantes de Atg y Slm35.....	29
7.2	Obtención de cepas dobles mutantes $\Delta atg x \Delta slm 35$	38
7.3	Extracción de DNA genómico de levadura	39
7.4	Cepas con las fusiones AtgX-VN.....	39
7.5	Generación de las cepas con la fusión Slm35-VC y Atg13-VC.....	40
7.6	Generación de cepas diploides AtgX-VN x Slm35-VC y AtgX-VN x Atg13-VC	41
7.7	PCR para corroboración de mutantes.....	41
7.8	Análisis electroforético de ácidos nucleicos.....	43
7.9	Ensayo de crecimiento por diluciones seriadas	43
7.10	Caracterización de fenotipo en respuesta a estrés oxidativo.....	44
7.11	Microscopía confocal	44
7.12	Ensayo de autofagia por estrés oxidativo	44
7.13	Extracción de proteínas totales.....	45
7.14	Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	45
7.15	Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa	46
7.16	Detección por quimioluminiscencia.....	46
8	Resultados	48
8.1	Caracterización del fenotipo de crecimiento en condiciones estándar de laboratorio de las cepas $\Delta atg 'x'$ y $\Delta atg x \Delta slm 35$	48
8.2	Estandarización de las condiciones de estrés oxidativo	51
8.3	Caracterización del fenotipo y el proceso de autofagia en las cepas $\Delta atg x$ y $\Delta atg x \Delta slm 35$ en condiciones de estrés oxidativo	53

8.3.1 Los pasos iniciales de la formación y expansión del fagóforo (PAS) son necesarios para que la ausencia de SLM35 confiera resistencia a estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno	53
8.3.2 La autofagia general se ve afectada al eliminar simultáneamente a los genes ATG11 y SLM35, por lo tanto se pierde el fenotipo de resistencia a estrés de la cepa $\Delta slm35$	57
8.3.3 La función de Slm35 durante la resistencia a estrés oxidativo requiere de la formación del fagóforo durante la autofagia selectiva dependiente de los genes ATG20, ATG21 y ATG24.....	58
8.3.4 La resistencia al estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ depende de la mitofagia y de la vía Cvt pero no de pexofagia	61
8.3.5 Los receptores específicos de autofagia y Slm35 no participan en el proceso de autofagia general en condiciones de estrés oxidativo	62
8.4 El ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular no fue exitoso para evaluar interacciones físicas de nuestro interés	63
9 Discusión.....	66
10 Conclusiones.....	72
11 Perspectivas.....	73
12.1 Verificación de mutantes $\Delta atgx$	74
12.2 Verificación de mutantes $\Delta atgx\Delta slm35$	74
12.3 Verificación de cepas con la construcción AtgX-VN	77
12.4 Verificación de las cepas con la fusión Slm35-VC y Atg13-VC.....	79
12.5 Medios de cultivo	81
12.6 Soluciones	85
12.7 Viabilidad celular en presencia de H ₂ O ₂ y tBOOH	86
13 Bibliografía	87

1 Resumen

La autofagia es un proceso catabólico por el cual se degradan elementos citoplasmáticos en el interior de la vacuola o lisosomas. Este proceso es importante para la homeostasis celular, para retrasar el envejecimiento, para el desarrollo y para generar las respuestas contra el estrés. Durante la autofagia general se degradan inespecíficamente componentes del citoplasma, sin embargo, también existen procesos de autofagia específica, como la mitofagia, en la cual solo las mitocondrias son degradadas.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la proteína mitocondrial Slm35 está involucrada en las respuestas a estrés oxidativo y al control de la longevidad celular. El gen *SLM35* presenta una interacción genética negativa con el gen *TOR1* y con genes que codifican para componentes de la autofagia. Además, mutantes nulas *SLM35* muestran un incremento en el flujo mitofágico por lo que se ha propuesto como un regulador negativo de la mitofagia. Sin embargo, aún no se conoce el mecanismo mediante el cual la proteína Slm35 participa en la autofagia.

En el presente trabajo evaluamos las interacciones genéticas del gen *SLM35* con genes que codifican para elementos de la autofagia general, la autofagia selectiva, la mitofagia, la pexofagia y la vía Cvt (*Cytoplasm-to-vacuole targeting*) en condiciones de estrés oxidativo con el objetivo de determinar cómo Slm35 participa en el proceso de autofagia bajo esta condición. También analizamos el proceso de autofagia general en ausencia de componentes de la autofagia y de Slm35.

Nuestros resultados muestran que la resistencia a estrés oxidativo previamente reportada para la cepa $\Delta slm35$ depende de los componentes de la autofagia general, de la mitofagia y de la vía Cvt, pero no de la pexofagia. Además, observamos que en ausencia de Atg11 y Slm35 la autofagia general se abate. Todo esto indica que el papel de la proteína mitocondrial Slm35 no está limitado a la mitofagia sino que puede jugar un papel importante junto con otras proteínas Atg durante la autofagia general.

2 Introducción

2.1 Autofagia

La macroautofagia (aquí referido como autofagia) es un proceso celular mediante el cual se degradan componentes celulares en los lisosomas (células de mamífero) o en las vacuolas (hongos y plantas). La autofagia se presenta como un mecanismo de respuesta a condiciones de estrés, además de ser un importante regulador de la homeostasis, del metabolismo, del crecimiento celular, así como de la senescencia y envejecimiento (Farré & Subramani, 2016).

Se han descrito tres tipos diferentes de autofagia morfológicamente diferentes: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia es aquella en donde el componente celular es almacenado en el autofagosoma y es entregado a los lisosomas/vacuolas para su degradación (Figura 1). La microautofagia en cambio hace referencia a una invaginación directa de la membrana de los lisosomas/vacuolas rodeando pequeños componentes citoplasmáticos o de organelos. Finalmente, en la autofagia mediada por chaperonas el componente celular destinado a degradación es guiado por chaperonas hacia el lisosoma, este tipo de autofagia ha sido descrita en células de mamíferos pero no en levaduras (Kanki, Furukawa, & Yamashita, 2015; Müller, Lu, & Reichert, 2015).

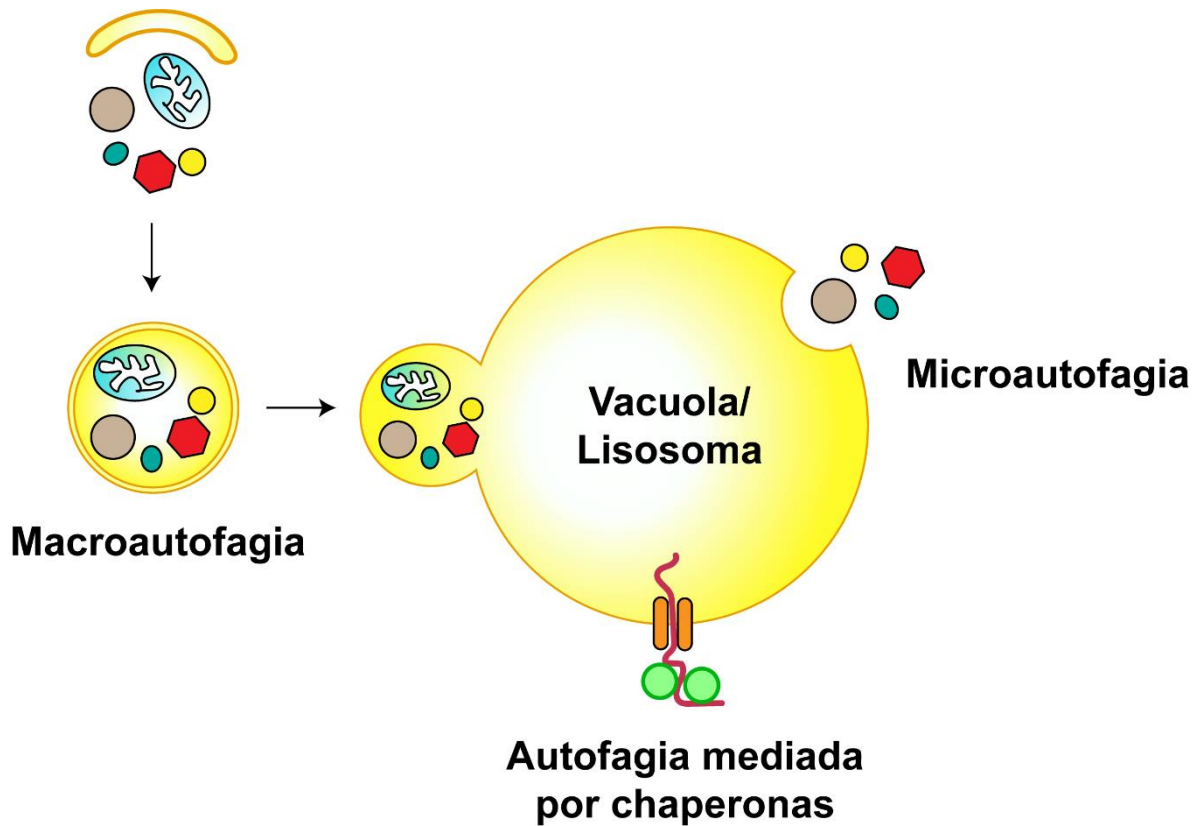


Figura 1. La autofagia se lleva a cabo por tres mecanismos diferentes: Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia se distingue por la formación del autofagosoma que envuelve los componentes citoplásmicos a degradar. La microautofagia se caracteriza por una invaginación de la vacuola. La autofagia mediada por chaperonas, un tipo de autofagia presente solo en células de mamíferos, requiere de proteínas chaperonas para dirigir el componente celular a degradar hacia el lisosoma.

La autofagia fue considerada inicialmente como un proceso inespecífico, sin embargo, en los últimos 15 años se ha descrito que ciertos organelos o proteínas blanco se degradan de manera dirigida. Entre estos tipos de autofagia específica se incluyen la mitofagia, la pexofagia, la ribofagia, la REfagia, la nucleofagia, la lipofagia o la agregofagia, que son procesos que degradan mitocondrias, peroxisomas, ribosomas, retículo endoplásmico, porciones nucleares, gotas lipídicas o agregados proteicos, respectivamente (Figura 2) (Farré & Subramani, 2016). La autofagia específica ocurre por macroautofagia, sin embargo, se ha reportado que la mitofagia, la pexofagia y la nucleofagia también suceden por microautofagia (Li, Li, & Bao, 2012).

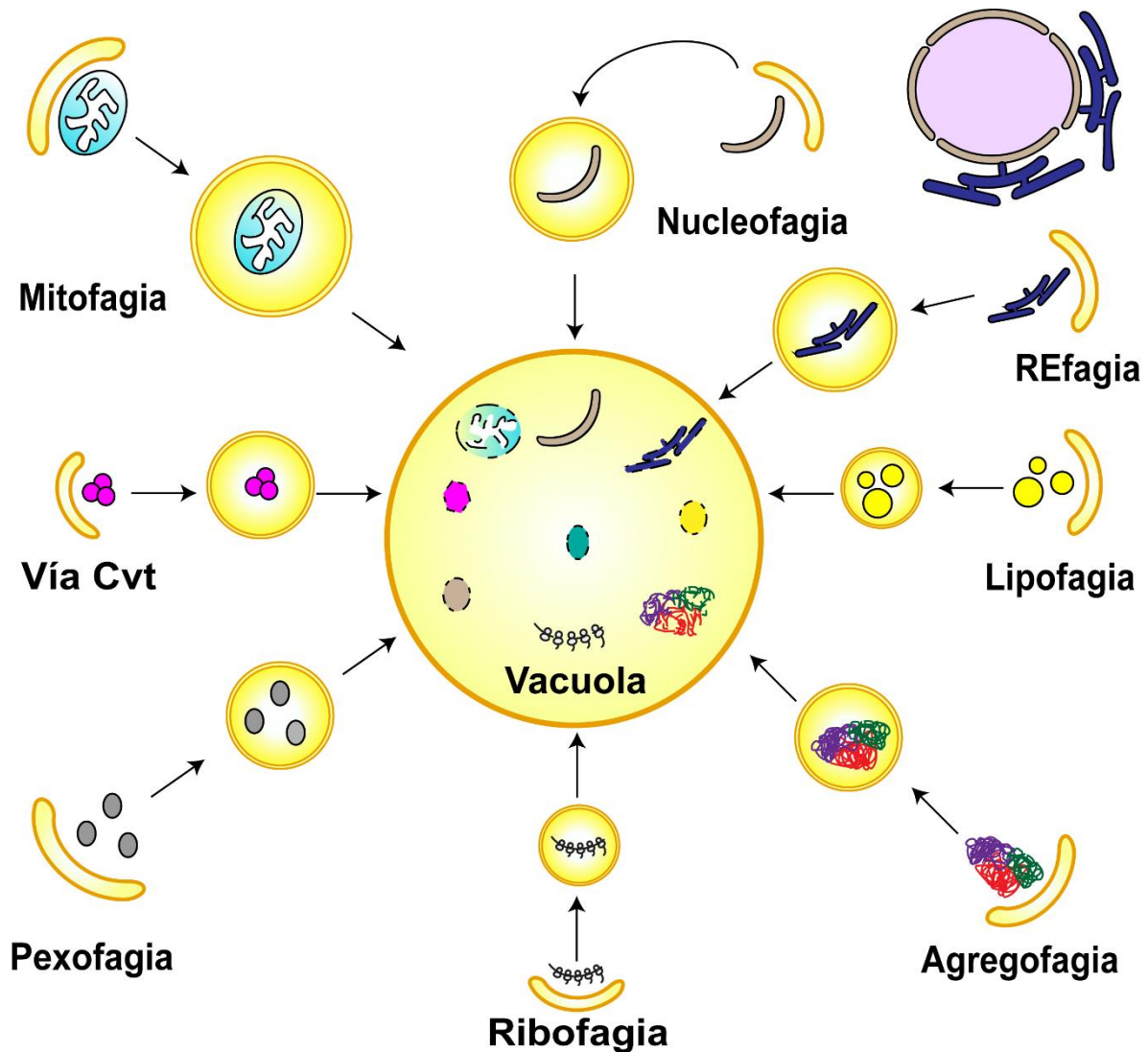


Figura 2. La autofagia selectiva degrada de manera específica los distintos organelos. La célula degrada de manera específica mediante autofagia distintos organelos dependiendo de las necesidades fisiológicas. Entre estos procesos selectivos se encuentran pero no se limitan a: mitofagia, la vía Cvt, pexofagia, ribofagia, agregofagia, lipofagia, nucleofagia y REfagia.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha descrito además la vía conocida como Cvt (por las siglas en inglés de “*Cytoplasm-to-vacuole targeting*”), la cual hace uso de la maquinaria autofágica para procesar los precursores de las proteínas aminopeptidasa 1 y la α -manosidasa en la vacuola, y es en este organelo donde estas proteínas son activas. La vía Cvt es otro tipo de autofagia específica (Kanki et al., 2015).

La maquinaria que controla el proceso de autofagia, ya sea selectiva o no selectiva, está codificada por los genes relacionados con autofagia denominados *ATG*. En *S. cerevisiae* se han descrito hasta ahora 40 genes *ATG* (Kanki et al., 2015; Parzych, Ariosa, Mari, & Klionsky, 2018), mismos que han sido clasificados en cinco módulos multifuncionales de acuerdo con el papel específico que juegan durante el proceso (Figura 3) (Farré & Subramani, 2016):

1. El complejo cinasa Atg1: compuesto por las proteínas Atg1, Atg13, Atg17, Atg29 y Atg31.
2. Las proteínas conjugadas: **Atg8-fosfatidiletanolamina (Atg8-FE)** y **Atg5-Atg12**. Las Atg involucradas en los sistemas de conjugación son:

Atg8-FE: Atg3, Atg4, Atg7 y Atg8.

Atg5-Atg12: Atg5, Atg7, Atg10, Atg12 y Atg16.
3. El complejo I de la clase III de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K): compuesto por las proteínas Atg6, Atg14, Atg38, y las proteínas de clasificación vacuolar Vps15 y Vps34.
4. El complejo compuesto por Atg2 y Atg18.
5. Las vesículas que contienen a la proteína integral de membrana Atg9.

En levaduras, la autofagia es un proceso fisiológico y puede ser exacerbado en condiciones de estrés, por ejemplo por daño en un organelo. Sin embargo, también puede ser activada en condiciones experimentales mediante una restricción calórica o por la inhibición directa de la cinasa Tor1 usando rapamicina. Estas señales provocan una hipofosforilación de Atg13 permitiendo su interacción con Atg1 y Atg17. Posteriormente, se reclutan vesículas que contienen Atg9, el complejo I de la PI3K, los sistemas de conjugación y el complejo Atg2-Atg18 expandiendo paulatinamente la membrana del autofagosoma que posteriormente se fusionará con la vacuola (Figura 3).

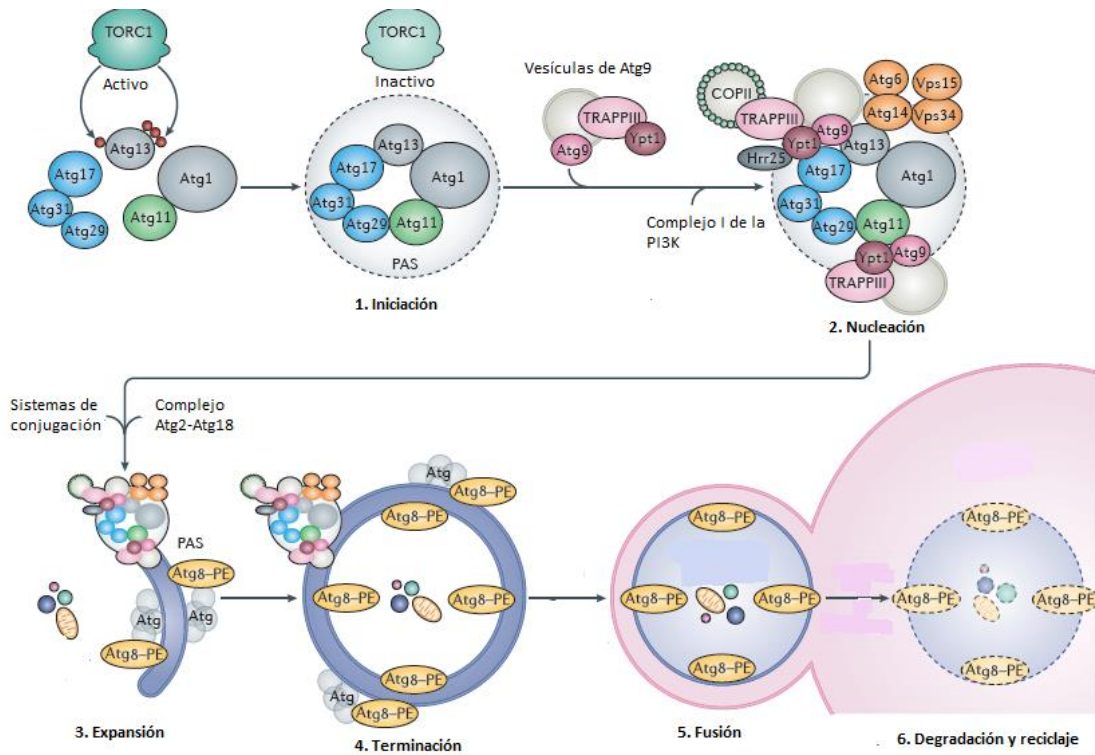


Figura 3. Pasos sucesivos durante el proceso de autofagia. En un medio rico en nutrientes el complejo TOR1 (TORC1) se encuentra activo y mantiene fosforilado a Atg13 impidiendo que se lleve a cabo la autofagia. Al iniciarse la autofagia por restricción calórica por ejemplo, se inhibe la función de TORC1 y Atg13 se encuentra hipofosforilado permitiendo la formación del complejo cinasa Atg1, siendo el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) (1. Iniciación). Posteriormente se reclutan las vesículas de Atg9, el complejo I de la PI3K y otros componentes de transporte vesicular (2. Nucleación). Los sistemas de conjugación y el complejo Atg2-Atg18 se unen al PAS para la expansión y terminación del fagóforo (3. Expansión y 4. Terminación). El autofagosoma formado se fusiona con la vacuola y la carga es degradada (5. Fusión y 6. Degradación y reciclaje). Modificada de Farré & Subramani, 2016.

Para cada uno de los diferentes tipos de autofagia selectiva se requieren otros factores que dirigen el flujo correcto del proceso autofágico. Entre estos factores se encuentran los receptores de autofagia selectiva en levadura (Tabla 1) (Farré & Subramani, 2016).

Tabla 1. Receptores asociados con los distintos tipos de autofagia selectiva.

Tipo de autofagia selectiva	Receptor asociado
Agregofagia	Cue5
Mitofagia	Atg32, Atg33
Pexofagia	Atg36
REfagia	Atg39, Atg40
Nucleofagia	Atg39
Vía Cvt	Atg19, Atg34

Para llevar a cabo la autofagia selectiva es necesario que el receptor específico sea activado mediante su fosforilación, lo cual recluta a Atg11 y a su vez a la cinasa Atg1 y a Atg17. Esta última, activa a Atg1 y permite el reclutamiento de Atg8 conjugado con fosfatidiletanolamina y el sistema de conjugación Atg5-Atg12 iniciando la expansión del fagóforo en la periferia del organelo a degradar. Es importante mencionar que el complejo Atg5-Atg12-Atg16 es reclutado por Atg18 o Atg21, esta última participa únicamente en autofagia selectiva como Atg11 (Figura 4; (Farré & Subramani, 2016; Ishihara & Mizushima, 2009; Nair, Cao, Xie, & Klionsky, 2010)).

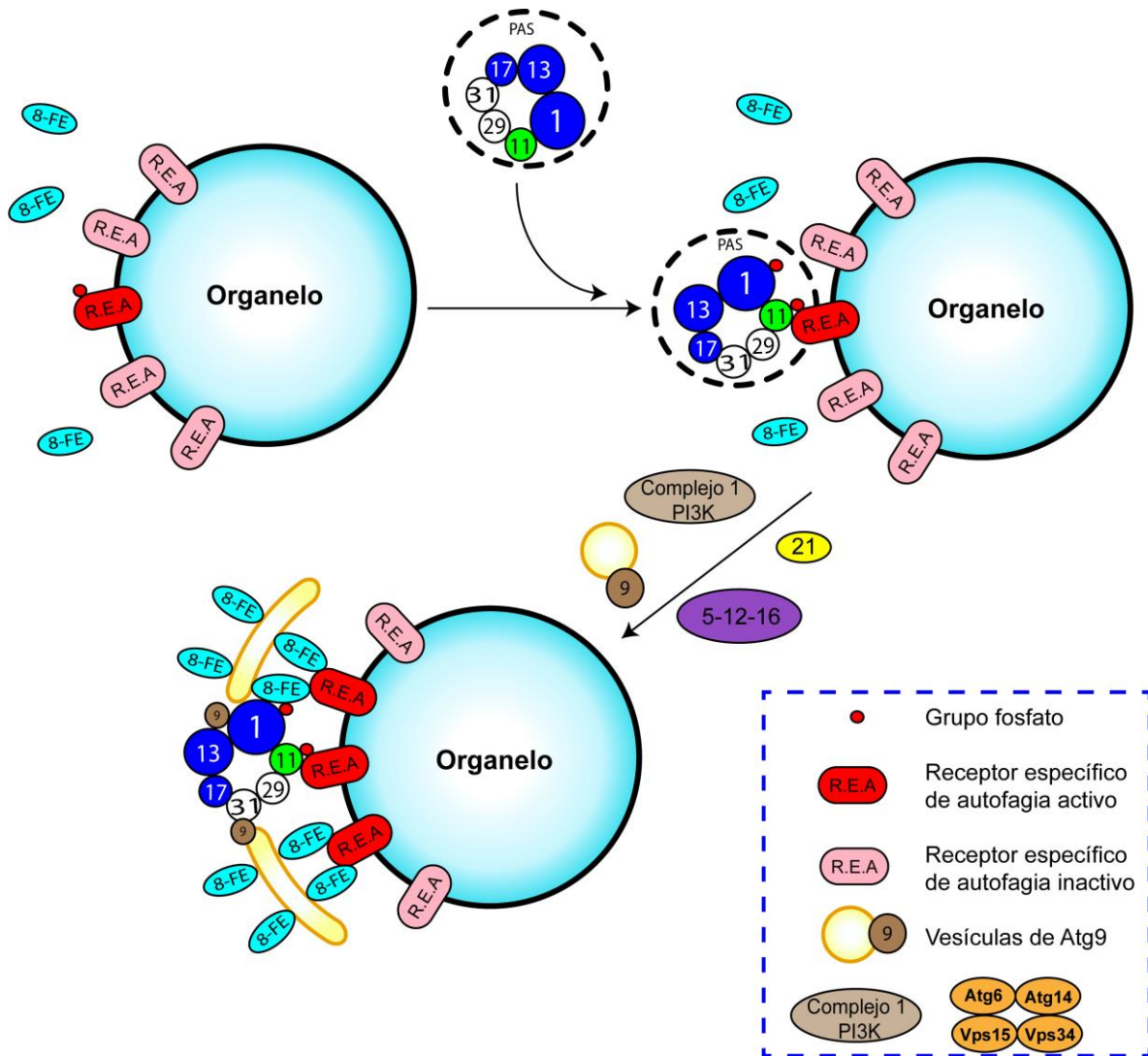


Figura 4. Papel de los receptores asociados a autofagia selectiva. Los receptores específicos de autofagia selectiva se activan por fosforilación de distintas cinasas dependiendo el receptor, esta activación permite la interacción con Atg11 y el reclutamiento de las proteínas Atg necesarias para la formación del autofagosoma. Los receptores alrededor del organelo cargo también se activan, de esta manera el organelo es envuelto por el fagóforo. Basada en Farré & Subramani, 2016.

2.2 Mitofagia

El término de mitofagia fue acuñado en el 2005 en experimentos realizados en *S. cerevisiae* (Lemasters, 2005) y se refiere al proceso celular que degrada específicamente mitocondrias vía autofagia. Este mecanismo puede ser inducido al someter a las células a estrés o a una restricción calórica. Además, la mitofagia

también participa en recambio mitocondrial mediante la degradación de fracciones de la red mitocondrial cuya función ha sido afectada; en casos de daño extremo cuando no se cubre por completo la degradación de las mitocondrias dañadas, la célula entra a apoptosis (Abeliovich & Dengjel, 2016; Müller et al., 2015) Es decir, una de las funciones fisiológicas de la mitofagia es mantener el control de calidad de la red mitocondrial (Kanki et al., 2015).

Se ha observado que el bloqueo de la mitofagia no aumenta la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) pero sí la cantidad de proteínas oxidadas (Abeliovich & Dengjel, 2016). La degradación de proteínas oxidadas depende del proceso de autofagia general (Carroll et al., 2018; Xiong, Contento, Nguyen, & Bassham, 2006).

A pesar que la mitofagia es un tipo de autofagia específica, no se ha definido de manera puntual si la degradación de las mitocondrias es vía macroautofagia o microautofagia (Kanki et al., 2015). Sin embargo, se ha identificado que para llevar a cabo el proceso de mitofagia, además de la maquinaria común de autofagia, es necesaria la participación de otros factores como Atg32, Atg33, Atg21 y la caseína cinasa 2 (CK2) (Kanki et al., 2015). Otro proceso esencial para que la mitofagia ocurra es la fisión mitocondrial, por lo que la proteína Dnm1 en levaduras también está relacionada con la mitofagia (Kanki et al., 2015; Müller et al., 2015).

2.3 Función de las proteínas relacionadas con la autofagia

2.3.1 Atg32, receptor de mitofagia

El receptor específico para el proceso de mitofagia es Atg32, el cual es indispensable para este proceso (Kanki & Klionsky, 2009; Koji Okamoto, Kondo-Okamoto, & Ohsumi, 2009). Esta proteína cuenta con un dominio transmembranal, el amino terminal está orientado hacia el citoplasma celular y el carboxilo terminal orientado hacia el espacio intermembranal. Se ha observado que la expresión de la proteína Atg32 alcanza un nivel máximo cuando las células están en

crecimiento, y decae cuando las células están en una fase post-logarítmica, posiblemente debido al proceso mitofágico en donde Atg32 es degradado en la vacuola junto con las mitocondrias. La expresión de Atg32 puede también inducirse en condiciones de estrés oxidativo (Koji Okamoto et al., 2009).

Atg32 interactúa físicamente con Atg8 y Atg11 a través de sitios de reconocimiento que se encuentran en el dominio citoplásmico. El sitio de reconocimiento para Atg8 se encuentra en el dominio WXXI en el extremo amino terminal de Atg32, y el de Atg11 entre los aminoácidos 51 y 150 (Saigusa et al., 2011).

En mamíferos, se ha identificado que la proteína Bcl2-L-13 funge como el receptor mitocondrial para mitofagia, y es homóloga de Atg32 (Murakawa et al., 2015). Además, se han descrito otros receptores para mitofagia en células de mamífero, entre los que se encuentran BNIP3, NIX/BNIP3L, FUNDC1 y PINK/Parkin (L. Liu, Sakakibara, Chen, & Okamoto, 2014).

2.3.1.1 Modificaciones postraduccionales de Atg32

Para que Atg32 sea funcional para el progreso de la mitofagia, es necesario que sufra modificaciones postraduccionales. Un paso importante es la fosforilación en las serinas 114 y 119. La fosforilación de la serina 114 es necesaria para la interacción con Atg11. La fosforilación de ambas serinas ocurre por la caseinasa 2 (CK2) (Saigusa et al., 2011).

Para que sea posible la interacción de Atg32 con Atg11 se ha observado que es necesario un corte en el extremo carboxilo terminal de Atg32, el cual se encuentra en el espacio intermembranal. Esto desencadena un cambio conformacional que permite la interacción con Atg11. Dicho corte es producido en la mitocondria por la proteasa Yme1 (Figura 5) (K. Wang, Jin, Liu, & Klionsky, 2013).

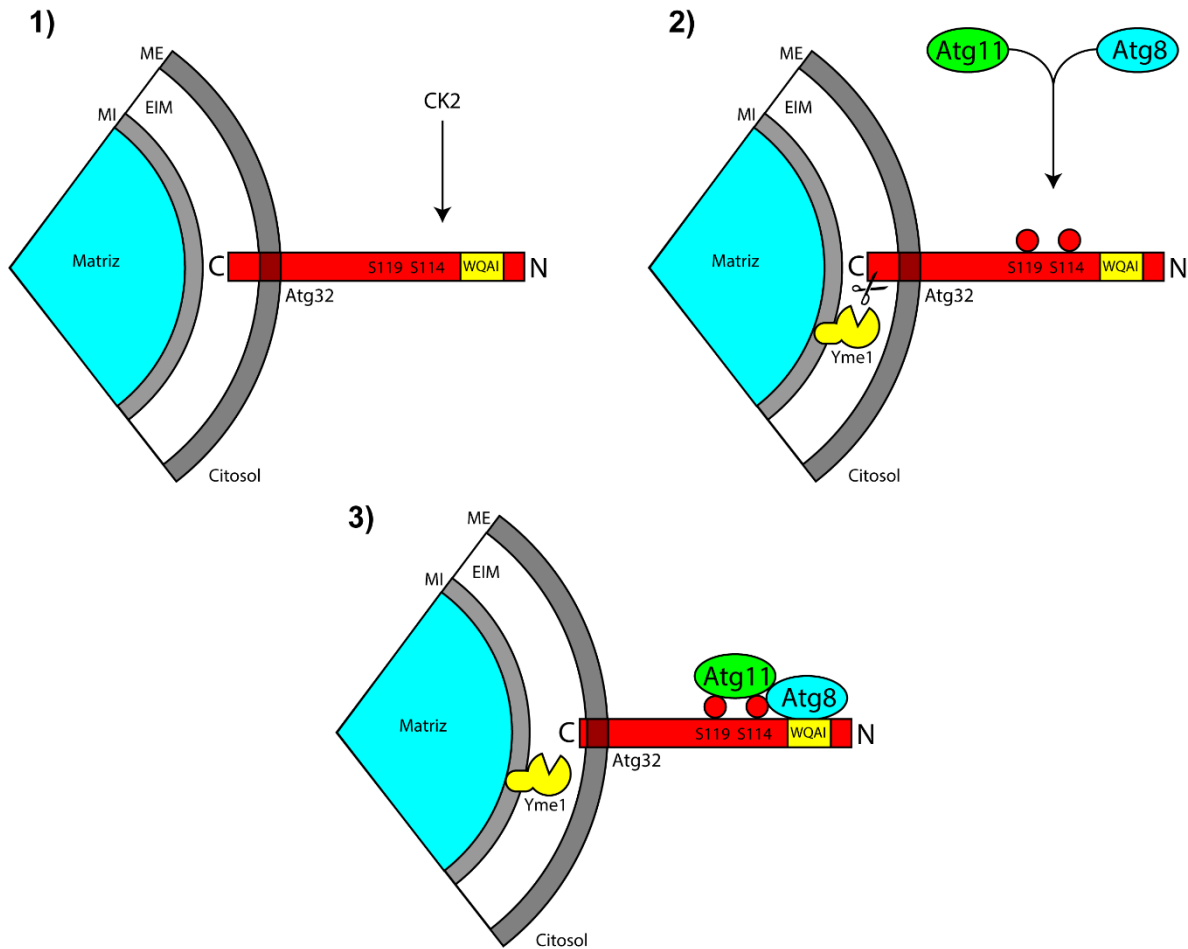


Figura 5. Modificaciones postraduccionales en Atg32 para llevar a cabo la mitofagia. Atg32 debe ser fosforilada por CK2 (1) y el corte en el carboxilo terminal mediado por Yme1 (2). Estas modificaciones postraduccionales favorecen la interacción con Atg8 y Atg11 (3). Basada en Müller, et al., 2015.

2.3.2 Atg33, receptor de mitofagia

Atg33 es una proteína que se localiza en la membrana externa mitocondrial y de manera predictiva se le asignan 5 dominios transmembranales (Huh et al., 2003).

La delección del gen *ATG33* disminuye el flujo mitofágico durante la fase post-logarítmica de crecimiento mientras que otros procesos de autofagia selectiva y no selectiva no se afectan, sugiriendo que Atg33 es una proteína que participa de manera específica en la mitofagia (Yen et al., 2009).

Hasta la fecha, los estudios sobre Atg33 son escasos, por lo cual no es conocida ni la vía de señalización en la que está involucrada, ni tampoco se conoce la orientación de los dominios amino y carboxilo terminal (Mizushima, 2010).

2.3.3 Atgs involucradas en la formación del fagóforo

El inicio de la autofagia se da con la formación del complejo cinasa Atg1 y del sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS). La ausencia de cualquiera de las proteínas que conforman estos complejos afecta negativamente tanto a la autofagia general como a la selectiva.

2.3.3.1 Atg1, cinasa del PAS

Atg1 es una cinasa de serinas y treoninas. El dominio cinasa se encuentra en el extremo amino terminal y en el extremo carboxilo se encuentra un dominio de interacción con microtúbulos y transporte vesicular. Estos dominios están altamente conservados entre levaduras y eucariontes superiores. La región que une ambos dominios es la menos conservada entre levaduras y mamíferos, y es considerada una región intrínsecamente desordenada (Noda & Fujioka, 2015; Noda & Inagaki, 2015). La cinasa similar a Unc-51 tipo 1 (ULK1) en células de mamíferos es homóloga a Atg1. Además, se ha reportado a ULK2 como un segundo homólogo de Atg1 con funciones redundantes a ULK1. Sin embargo los resultados hasta el momento no son claros respecto a la función de ULK2 en la autofagia.

Atg1 forma un complejo activador de la autofagia general mediante la interacción con otras Atgs, las cuales son: Atg13, Atg17, Atg29 y Atg31. Para la autofagia selectiva se requiere de la interacción de Atg11 con el complejo Atg1. La formación de este complejo estimula la actividad cinasa de Atg1, la cual se autofosforila y fosforila otras Atgs (Mizushima, 2010; Noda & Fujioka, 2015; Noda & Inagaki, 2015). A diferencia de la formación del complejo de Atg1 (Atg1, Atg13, Atg17, Atg29 y Atg31) en levaduras, el complejo ULK1/2 está formado únicamente

por ULK1/2, mAtg13, FIP200 (funcionalmente similar a Atg17), y Atg101 (Mizushima, 2010; Noda & Fujioka, 2015; Noda & Inagaki, 2015).

Debido a que la formación del complejo de Atg1 ocurre al inicio de la activación de la autofagia, es un proceso que está altamente regulado. La principal vía de regulación de Atg1 está gobernada por la actividad del complejo TOR1 (TORC1) (*target of rapamycin*), el cual actúa en condiciones de inanición. En un medio rico en nutrientes, TORC1 mantiene fosforilada a la proteína Atg13, disminuyendo su afinidad por Atg1 y por lo tanto inhibiendo la formación del complejo Atg1 y el progreso de la autofagia. En mamíferos se ha descrito que el complejo mTOR1 interactúa físicamente con la proteína ULK1 y la fosforila, disminuyendo su actividad tal y como se observa en Atg1 de levadura. Algo similar sucede también en *Drosophila melanogaster*, es decir, Tor es un regulador negativo de la autofagia mediante la inhibición de Atg1 (Mizushima, 2010; Noda & Fujioka, 2015). Ya que Atg1 es un componente esencial de las primeras etapas de la autofagia e interactúa con Atg11, al eliminar el gen *ATG1* la mitofagia también se encuentra afectada (Taylor et al., 2014).

2.3.3.2 Atg13, proteína de andamiaje del PAS

Atg13 es una proteína que forma parte del complejo Atg1 y funciona como punto de andamiaje para Atg1 y Atg17, y por lo tanto es esencial para el ensamblaje del fagóforo (Alers, Wesselborg, & Stork, 2014).

El amino terminal de Atg13 presenta un dominio HORMA (Hop1, Rev1 y Mad2). Este dominio es importante para el acoplamiento con Atg14 (miembro del complejo I de la PI3K clase III), paso importante para la inducción de autofagia (Alers et al., 2014). Además, este dominio tiene la capacidad de unirse a lípidos, lo cual sugiere una interacción con vesículas que contienen a Atg9 (Popelka & Klionsky, 2017; Yamamoto et al., 2016). La secuencia que sigue al dominio HORMA es una región intrínsecamente desordenada, la cual tiene dos sitios de unión para Atg17 y uno más para Atg1, por lo tanto Atg13 media la formación de un complejo Atg1 supramolecular (Yamamoto et al., 2016).

En condiciones normales, Atg13 se fosforila mediante TORC1. Este estado fosforilado impide la interacción de Atg13 con Atg1. Mientras que un estado de restricción calórica o mediante el uso de rapamicina, TORC1 se inactiva y por ende, Atg13 se desfosforila, permitiendo entonces la activación del complejo Atg1 (Alers et al., 2014; Farré & Subramani, 2016). Además de su participación en autofagia no selectiva, también se ha descrito que participa en autofagia selectiva, tanto en la vía Cvt como en mitofagia (Alers et al., 2014; Eiyama, Kondo-Okamoto, & Okamoto, 2013; Nice, Veenhuis, et al., 2002).

2.3.3.3 Atg17, formación del PAS y fusión del autofagosoma con la vacuola

Atg17 forma un complejo proteico junto con Atg31 y Atg29 con una estequiometría 2:2:2. Este complejo es necesario para la función de Atg17 en la autofagia. La estructura de Atg17 consiste en cuatro hélices alfa, dos de cada monómero de Atg17 y la unión de estos le otorga a Atg17 una arquitectura en forma de S, siendo el extremo carboxilo terminal una región intrínsecamente desordenada en donde se encuentra el sitio de interacción de los dos protómeros de Atg17 (Ragusa, Stanley, & Hurley, 2012). Los sitios de unión de Atg31 y Atg29 se encuentra en el amino terminal (Noda & Inagaki, 2015). Atg17 interactúa físicamente también con Atg13 en dos puntos, uno localizado en el dominio amino terminal y el otro en el dominio carboxilo terminal (Fujioka et al., 2014; Yamamoto et al., 2016).

Después de ser desfosforilado, Atg13 es capaz de interactuar con el complejo Atg17-Atg31-Atg29 y junto con Atg1 se forma el complejo Atg1 cinasa, esencial para el inicio de la autofagia (Farré & Subramani, 2016). Sin embargo, también se ha descrito que Atg17 participa en etapas tardías de autofagia, específicamente durante la fusión del autofagosoma con la vacuola debido a la interacción de Atg17 con la proteína SNARE vacuolar Vam7. Esta interacción asegura que el autofagosoma pueda fusionarse con la vacuola (X. Liu et al., 2016).

El papel de Atg17 tanto en etapas tempranas como tardías de la autofagia, hacen que esta proteína sea esencial para el proceso de autofagia general y los

distintos tipos de autofagia selectiva (Kabeya et al., 2005; X. Liu et al., 2016; Schlotterhose et al., 2013).

La interacción de las Atgs descritas anteriormente se presenta de manera esquemática en la figura 6.

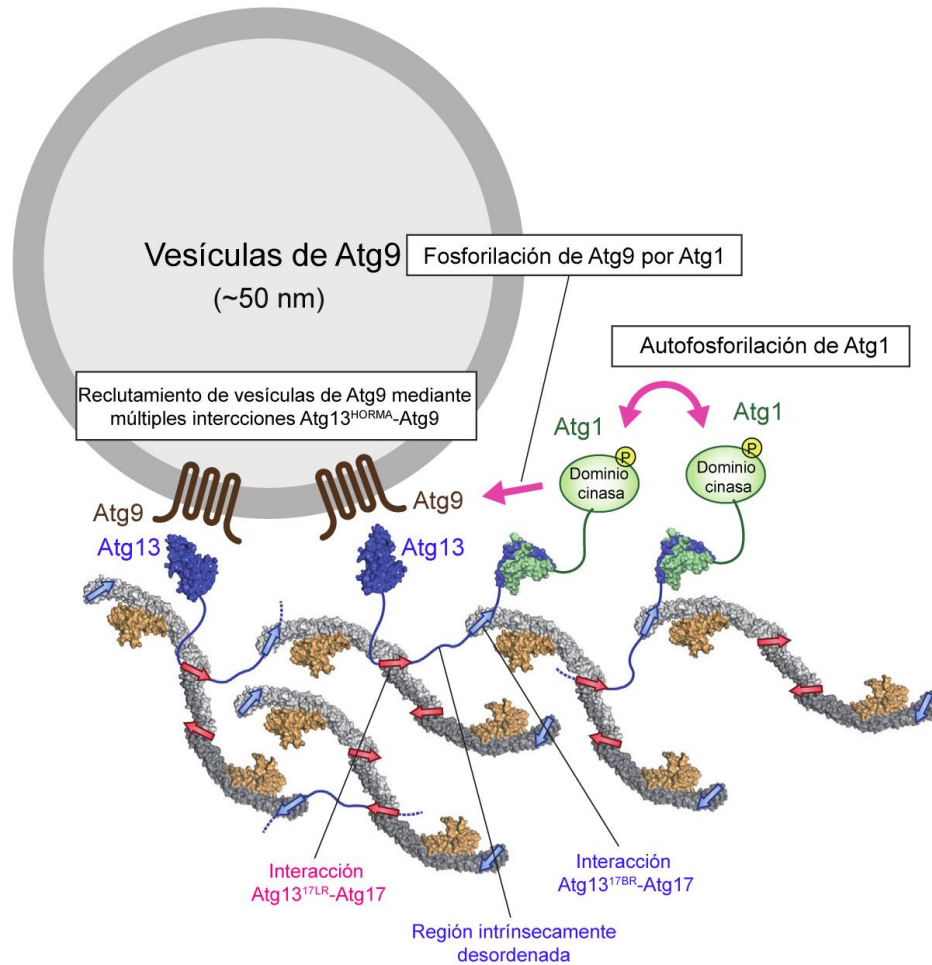


Figura 6. El sitio de ensamblaje de fagóforo está formado por las proteínas Atg1, Atg13 y Atg17. Se muestra un modelo que representa los sitios de unión entre cada una de las Atgs para dar lugar al PAS. Una vez formado el PAS, Atg13 interactúa con Atg9 para dar lugar a la nucleación del fagóforo y continuar con el proceso de autofagia. Modificada de Yamamoto, et al., 2016.

2.3.4 Atg8 y la expansión de fagóforo

Atg8 se conjuga con el fosfolípido fosfatidiletanolamina (FE), formando el complejo Atg8-FE. Esta proteína conjugada es importante para la formación, expansión y

cierre del autofagosoma, así como para el acoplamiento de las cargas de la autofagia selectiva en el autofagosoma mediante proteínas adaptadoras como Atg11 (Noda & Inagaki, 2015; Slobodkin & Elazar, 2013).

Los cambios postraduccionales que deben presentarse para la conjugación de Atg8 y FE siguen una secuencia de corte, activación y conjugación. En primer lugar la proteína Atg4 corta la arginina localizada en el extremo carboxilo, exponiendo una glicina. A continuación Atg7 activa a Atg8 y finalmente Atg3 realiza la conjugación con FE (K. Okamoto et al., 2015; Slobodkin & Elazar, 2013). Es necesario que Atg8 sea reciclado una vez que el autofagosoma se haya fusionado con la vacuola, por lo que FE se corta de Atg8 y este proceso es realizado por Atg4 (K. Okamoto et al., 2015).

Todas las proteínas que interactúan con Atg8 presentan un motivo AIM (motivo de interacción con Atg8). Entre ellas se encuentran Atg19, Atg32 y Atg36 que participan en autofagia selectiva, además de Atg3 que participa en el proceso de conjugación (Farré, Burkenroad, Burnett, & Subramani, 2013; Noda, Ohsumi, & Inagaki, 2010).

En *S. cerevisiae*, la delección del gen *ATG8* provoca una ausencia de autofagia general debido a su papel indispensable en la expansión del fagóforo, (Nakatogawa, Ichimura, & Ohsumi, 2007), por lo cual Atg8 también es fundamental para el proceso de autofagia selectiva (Taylor et al., 2014; Yen et al., 2009).

2.3.5 Atgs con papeles importantes en la autofagia selectiva

Además de las Atgs que participan en la autofagia general, hay otras que lo hacen exclusivamente en la autofagia selectiva. En los siguientes apartados se describen algunas de estas Atgs, las cuales tienen papeles importantes en el proceso de mitofagia.

2.3.5.1 Atg11, dirigiendo el organelo blanco al PAS

Atg11 es una proteína esencial durante el proceso de autofagia selectiva ya que funciona como una proteína de andamiaje entre los receptores asociados a cada tipo de autofagia y en la formación del sitio de ensamblaje del fagóforo y también en el reclutamiento de los sistemas conjugados Atg8-FE y Atg5-Atg12-Atg16 (Farré & Subramani, 2016; Kanki & Klionsky, 2008). Por lo anterior, Atg11 participa de manera específica durante la autofagia selectiva interactuando con Atg19 para la vía Cvt, con Atg36 para pexofagia y con Atg32 para mitofagia (Delorme-Axford & Klionsky, 2015; Kuninori Suzuki, 2013). Además, se ha descrito que Atg11 interactúa físicamente con Atg1 y con Atg17 para favorecer la activación del complejo Atg1 cinasa y su reclutamiento hacia el organelo a degradar, e interactúa con las vesículas que contienen Atg9, mostrando un papel importante en la formación de PAS en los pasos iniciales de la autofagia selectiva (Backues & Klionsky, 2012; Delorme-Axford & Klionsky, 2015).

Otro mecanismo mediante el cual Atg11 facilita la mitofagia en etapas tempranas es el reclutamiento hacia la red mitocondrial de Dnm1, una GTPasa que participa en la fisión mitocondrial, sugiriendo que la fisión mitocondrial es un paso necesario para llevar el proceso de mitofagia (Mao, Wang, Liu, & Klionsky, 2013). Atg11 también participa en etapas tardías de la autofagia selectiva, esto debido a la interacción física con la proteína SNARE vacuolar Vam7 que es importante para la fusión del autofagosoma con la vacuola (X. Liu et al., 2016).

2.3.5.2 Atg21, expansión del fagóforo en la autofagia selectiva

Atg21 tiene dominios de unión para fosfoinosítidos, principalmente fosfatidilinositol 3 fosfato, el cual participa en la formación de vesículas y en la formación del fagóforo. Atg21 participa en todos los tipos descritos de autofagia selectiva salvo en pexofagia (Farré & Subramani, 2016; Strømhaug, Reggiori, Guan, Wang, & Klionsky, 2004). En el caso particular de la mitofagia, Atg21 juega un papel fundamental debido a su participación en la formación y expansión del fagóforo

pero no es esencial para la autofagia general (Barth, Meiling-Wesse, Epple, & Thumm, 2002; Yen et al., 2009).

Se ha propuesto que Atg21 participa directamente durante la formación del autofagosoma alrededor de las cargas selectivas reclutando el complejo Atg8-FE, además de ser también importante en el reclutamiento del complejo Atg5-Atg12-Atg16. A pesar de esta relación directa entre Atg21 y la formación y expansión del fagóforo, no se ha mostrado que esta proteína tenga un papel esencial durante el proceso de autofagia general (Juris et al., 2015; Krick & Thumm, 2016; Nair et al., 2010; Strømhaug et al., 2004).

2.3.5.3 Atg20 y Atg24, involucradas en la formación y expansión del fagóforo

Atg20 y Atg24 se describieron primero como componentes de la vía Cvt. Al igual que Atg21, presentan dominios de unión a fosfatidilinositol 3 fosfato. Pero a diferencia de Atg21, estas proteínas sí participan en la pexofagia. Además se ha observado que interactúan con Atg17 en el sitio de ensamblaje del fagóforo, sin embargo el proceso de autofagia no selectiva no se ve alterado (Du et al., 2016; Nice, Sato, Stromhaug, Emr, & Klionsky, 2002).

Estas proteínas tienen la capacidad de formar heterodímeros Atg20/Atg24, además de homodímeros de Atg24. La ausencia de Atg20 o Atg24 afectan al proceso de mitofagia, de pexofagia, de REfagia y de la vía Cvt, posiblemente debido a que en ausencia de estas proteínas, el tamaño del autofagosoma es menor (Du et al., 2016; Yen et al., 2009).

Las características y papeles de cada Atg expuesta anteriormente se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características y roles de las Atg.

Atg	Localización celular	Dominios	Papel en la autofagia	Autofagia en la $\Delta atg'x'$	Mitofagia en la $\Delta atg'x'$
Atg1	Citoplasma	Dominio cinasa en el extremo amino terminal. Dominio de interacción con microtúbulos y transporte vesicular en el extremo carboxilo terminal	Formación del sitio de ensamblaje del fagóforo. Cinasa	Ausente	Ausente
Atg13	Citoplasma	Dominio HORMA (Hop1, Rev1 y Mad2) en el extremo amino terminal. Región intrínsecamente desordenada	Formación del sitio del ensamblaje del fagóforo	Ausente/ Disminuida	Disminuida
Atg17	Citoplasma	Región intrínsecamente desordenada en el extremo carboxilo terminal	Formación del sitio de ensamblaje del fagóforo	Ausente	Ausente/ Disminuida
Atg8	Citoplasma	Dominio similar a ubiquitina	Expansión y cierre del fagóforo	Ausente/ Disminuida	Ausente/ Disminuida
Atg11	Citoplasma		Proteína de andamiaje entre el receptor específico de autofagia y el fagóforo	Normal	Ausente/ Disminuida
Atg20	Citoplasma	Dominio de unión a fosfoinosítidos	Expansión del fagóforo en autofagia selectiva	Normal	Disminuida
Atg21	Citoplasma	Dominio de unión a fosfoinosítidos	Expansión del fagóforo en autofagia selectiva	Disminuida	Disminuida
Atg24	Citoplasma	Dominio de unión a fosfoinosítidos	Expansión del fagóforo en autofagia selectiva	Normal	Disminuida

Atg32	Membrana externa mitocondrial	Un dominio transmembrana	Receptor de mitofagia	Normal	Ausente
Atg33	Membrana externa mitocondrial	Cinco dominios transmembranales	Receptor de mitofagia	Normal	Disminuida

2.4 Respuestas celulares a estrés

Los organismos vivos tienen la capacidad de responder a cambios en el medio ambiente a través modificaciones en el metabolismo. Los cambios en el ambiente que alteran el estado fisiológico de los organismos vivos son considerados como estrés. Entre los tipos de estrés a los que las células se enfrentan, están el estrés térmico, estrés oxidativo y estrés calórico. El primero se refiere a cambios en la temperatura del medio que afectan el comportamiento celular. El estrés oxidativo se observa como un desbalance en los mecanismos de producción de ROS y los que los degradan, siendo la principal fuente de ROS la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Por último, la ausencia de nutrientes en el medio causa un cambio en el metabolismo celular para que el organismo sobreviva a dicho estrés calórico (Morano, Grant, & Moye-Rowley, 2012).

La célula puede activar diferentes estrategias en respuesta a cada uno de los tipos de estrés mencionados. Para el caso de estrés térmico, tiene la capacidad de sintetizar proteínas de respuesta a estrés térmico como Hsf1, Msn2 y Msn4 y chaperonas Hsp70 y Hsp90 (Morano et al., 2012). El estrés térmico también induce estrés de retículo endoplásmico debido al mal plegamiento de proteínas, con lo cual el retículo endoplásmico responde con la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) (Song, Tan, Miao, & Zhang, 2018). El estrés de retículo endoplásmico genera autofagia para degradar proteínas mal plegadas y agregados de proteínas (agregofagia), además, la degradación de porciones de retículo endoplásmico vía autofagia (REfagia) es un mecanismo de reparación de este organelo (Song et al., 2018).

Para responder a condiciones de estrés oxidativo, *S. cerevisiae* sintetiza diferentes proteínas en respuesta a un aumento en ROS. Entre estas están Yap1, Skn7, además de aumentar la síntesis de defensas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión oxidoreductasa (Morano et al., 2012). Sin embargo, moléculas como lípidos, DNA y proteínas son susceptibles al estrés oxidativo, por lo que la degradación de estas moléculas dañadas vía autofagia es un mecanismo que las células adoptan para contender contra el estrés oxidativo (Filomeni, De Zio, & Cecconi, 2015). Debido a que la mitocondria es la principal fuente de ROS, otra respuesta celular ante este estrés es la mitofagia, con la finalidad de eliminar aquellas mitocondrias no funcionales o dañadas por el estrés oxidativo (Abeliovich & Dengjel, 2016).

Una estrategia con la que cuentan las células durante el estrés calórico es la autofagia, por la cual se degradan y reciclan componentes citosólicos y porciones de organelos para proporcionar a la célula elementos básicos para el anabolismo de moléculas celulares esenciales (Farré & Subramani, 2016; Kiel, 2010).

3 Antecedentes directos

3.1 Slm35 y su papel en *S. cerevisiae*

La proteína Slm35 “*Stress response and longevity mitochondrial factor*” es una proteína mitocondrial de una masa molecular aproximada de 35 kDa que primero se relacionó con la biogénesis mitocondrial y con la herencia del DNA mitocondrial. Esto se observó en un estudio a gran escala, en donde la mutante en este gen mostró pérdida en el DNA mitocondrial y una alta frecuencia en la pérdida de la función mitocondrial (Hess, Myers, Huttenhower, Hibbs, & Hayes, 2009; Leidhold et al., 2009; Reinders, Zahedi, Pfanner, Meisinger, & Sickmann, 2006).

El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos de la proteína Slm35 predice un dominio de escramblasa de fosfolípidos. Las escramblasas son proteínas transmembranales involucradas en la regulación espacial de fosfolípidos en las membranas celulares. Estas proteínas son ATP independientes y activadas por Ca^{2+} (Sivagnanam, Palanirajan, & Gummadi, 2017). En humanos se han descrito 4 escramblasas de fosfolípidos (hPLSCR1-4). Las hPLSCR1 y 4 se encuentran en membrana plasmática y núcleo, la hPLSCR2 se encuentra únicamente en núcleo y la hPLSCR3 tiene una localización mitocondrial (Sivagnanam et al., 2017). Nosotros realizamos un alineamiento *in silico* de las secuencias de aminoácidos de Slm35 y de hPLSCR3 con la herramienta bioinformática MUSCLE Alignment (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/). El alineamiento mostró que estas proteínas presentan 20.0% de identidad y 35.7% de similitud en sus cadenas de aminoácidos, lo que sugiere que Slm35 es el homólogo en levaduras de hPLSCR3. Sin embargo, a diferencia de la hPLSCR3, la predicción *in silico* de Slm35 no predice la presencia de un dominio transmembrana, además que su actividad escramblasa no ha sido determinada.

En nuestro laboratorio se ha observado que la cepa mutante $\Delta slm35$ presenta resistencia a estrés oxidativo y a estrés térmico en comparación a la cepa silvestre. También se observó que el gen *SLM35* presenta una interacción genética negativa importante con el gen *TOR1*, ya que la eliminación simultánea

de los genes *SLM35* y *TOR1* impide que las células sean capaces de sobrevivir en condiciones de estrés oxidante o térmico. Además, la longevidad celular se ve disminuida. Estos efectos no son observados en ausencia de uno solo de estos genes (Aguilar-Lopez et al., 2016). En el laboratorio también se encontró que el gen *SLM35* presenta interacciones genéticas negativas con genes que codifican para proteínas involucradas en la autofagia como lo son Atg1, Atg4, Atg6, Atg17 y Atg21. Esto se observó cuando en ausencia de ambos elementos (*Slm35-Atg'X'*), la sobrevivencia celular en condiciones de estrés térmico fue menor, lo que sugiere que *Slm35* está involucrado en el proceso autofágico bajo estas condiciones (Aguilar-Lopez et al., 2016). La autofagia es un mecanismo de respuesta a estrés oxidativo, además desarrollar un papel importante en la longevidad celular, con lo que *Slm35* podría participar en el proceso de autofagia durante la respuesta a estrés oxidativo y en la longevidad celular.

Debido a que *Slm35* es una proteína mitocondrial también se evaluó la mitofagia, y se encontró que la delección de *SLM35* aumenta el flujo mitofágico. Por lo tanto, se propone a *Slm35* como un regulador negativo de la mitofagia. Sin embargo, no se conoce el mecanismo por el cual *Slm35* participa en la autofagia ni en la mitofagia (Aguilar-Lopez et al., 2016).

4 Planteamiento del problema

La relación funcional de Slm35 con la cinasa Tor1 durante respuestas a estrés y en el control de la longevidad celular sugiere que Slm35 participa en estos procesos celulares de una manera similar a Tor1. El papel de Slm35 como regulador negativo de la mitofagia y las interacciones genéticas entre el gen *SLM35* y los genes de distintas *ATG* (*ATG'X'*) permitieron postular a Slm35 como un factor que participa en el proceso de autofagia. Sin embargo, no se conoce cuál es el mecanismo preciso mediante el cual Slm35 se involucra en los procesos de autofagia y mitofagia, o en qué punto de la cascada autofágica participa. Por lo tanto, en este trabajo nos propusimos determinar cuál es la relación funcional entre Slm35 y los componentes de autofagia general y selectiva.

5 Hipótesis

La proteína mitocondrial Slm35 coopera con las proteínas Atg que participan en la autofagia general y selectiva, haciéndola un componente de la maquinaria autofágica en respuesta a condiciones de estrés oxidativo en *S. cerevisiae*.

6 Objetivos

6.1 Objetivo general

Determinar la relación funcional de *SLM35* con los genes de la maquinaria de autofagia general y selectiva en *S. cerevisiae*.

6.2 Objetivos particulares

- Analizar las interacciones genéticas entre los genes *SLM35* y *ATG1*, *ATG8*, *ATG13* y *ATG17* (involucrados en autofagia general), *ATG11*, *ATG20*, *ATG21* y *ATG24* (participes en la autofagia selectiva) y *ATG32* y *ATG33* (receptores de mitofagia) en condiciones estándar de laboratorio y de estrés oxidativo.
- Estudiar las posibles interacciones físicas de las proteínas codificadas por los genes anteriores.
- Evaluar el proceso de autofagia en ausencia del gen *SLM35* en combinación con la eliminación de los diferentes genes *ATG* en condiciones estándar de laboratorio y de estrés oxidativo.

7 Materiales y métodos

7.1 Mutantes de Atg y Slm35

Cepas utilizadas durante el proyecto de investigación.

Nombre	Fondo genético	Genotipo	Referencia
WT	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Brachmann et al. 1998
<i>Δslm35</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 slm35::KanMX</i>	Aguilar-López, et al. 2016
<i>Δatg1</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg1::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg8</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg8::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg11</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg11::KanMX</i>	Este trabajo
<i>Δatg13</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg13::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg17</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg17::KanMX</i>	Este trabajo
<i>Δatg20</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg20::KanMX</i>	Este trabajo
<i>Δatg21</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg21::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg24</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg24::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg32</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg32::KanMX</i>	Este trabajo
<i>Δatg33</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0 atg33::KanMX</i>	Euroscarf
<i>Δatg19</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf

		<i>atg19::KanMX</i>	
Δatg36	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg36::KanMX</i>	Euroscarf
Δatg1Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg1::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg8Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg8::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg11Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg11::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg13Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg13::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg17Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg17::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg20Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg20::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg21Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg21::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg24Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg24::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg32Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg32::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg33Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg33::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg19Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg19::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg36Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg36::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg33Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg33::KanMX slm35::HphMX</i>	Este trabajo
Δatg32		<i>atg32::natMX</i>	
WT	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo

pGFP-Atg8		<i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>slm35::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg1	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg1::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg8	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg8::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg11	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg11::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg13	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg13::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg17	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg17::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg20	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg20::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg21	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg21::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg24	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg24::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg32	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg32::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg33	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg33::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg19	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg19::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg36	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg36::KanMX pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg1Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg1::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg8Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo

pGFP-Atg8		<i>atg8::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg11Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg11::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg13Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg13::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg17Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg17::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg20Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg20::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg21Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg21::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg24Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg24::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg32Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg32::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg33Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg33::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg19Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg19::KanMX slm35::HphMX</i> <i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
Δatg36Δslm35	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Este trabajo
pGFP-Atg8		<i>atg36::KanMX slm35::HphMX</i>	

		<i>pRS316-GFP-ATG8</i>	
<i>Δatg33Δslm35</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>atg33::KanMX slm35::HphMX</i> <i>atg32::natMX pRS316-GFP-ATG8</i>	Este trabajo
<i>Δatg32</i>			
pGFP-Atg8			
<i>Δslm35Δatg20</i>	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>slm35::KanMX atg20::HphMX</i>	Este trabajo
BY4742	BY4742	MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0</i> <i>ura3Δ0</i>	Brachmann et al. 1998
Atg1-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG1-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg8-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG8-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg11-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG11-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg13-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG13-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg17-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG17-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg20-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG20-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg21-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG21-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg24-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG24-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Atg32-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>ATG32-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Tor1-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>TOR1-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Slm35-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i> <i>SLM35-VN::KIURA3</i>	Sung MK et al. 2007
Ssb2-VN	BY4741	MATa <i>his3Δ1 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Sung MK et al.

		<i>SSB2-VN::KIURA3</i>	2007
Slm35-VC	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 SLM35-VC::KANMX6</i>	Este trabajo
Atg13-VC	BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0 ATG13-VC::KANMX6</i>	Este trabajo
Atg1-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG1-VN::KIURA3/ATG1 SLM35- VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg8-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG8-VN::KIURA3/ATG8 SLM35- VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg11-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG11-VN::KIURA3/ATG11 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg13-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG13-VN::KIURA3/ATG13 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg17-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG17-VN::KIURA3/ATG17 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg20-VN	BY4741 X	<i>MATα/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo

Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG20-VN::KIURA3/ATG20 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg21-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG21-VN::KIURA3/ATG21 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Atg32-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG24-VN::KIURA3/ATG24 SLM35-VC::KANMX6/SLM35</i>	
Tor1-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 TOR1-VN::KIURA3/TOR1 SLM35- VC::KANMX6/SLM35</i>	
Slm35-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 SLM35-VN::KIURA3 SLM35- VC::KANMX6</i>	
Atg1-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Atg13-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15 lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 ATG1-VN::KIURA3/ATG1 ATG13- VC::KANMX6/ATG13</i>	
Atg17-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Atg13-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15</i>	

		<i>lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0</i>	
		<i>ATG17-VN::KIURA3/ATG17</i>	
		<i>ATG13-VC::KANMX6/ATG13</i>	
Ssb2-VN	BY4741 X	<i>MATa/α his3Δ1/his3Δ1</i>	Este trabajo
Slm35-VC	BY4742	<i>leu2Δ0/leu2Δ0 met15Δ0/MET15</i> <i>lys2Δ0/LYS2 ura3Δ0/ura3Δ0 SSB2-</i> <i>VN::KIURA3/SSb2 SLM35-</i> <i>VC::KANMX6/SLM35</i>	

Las mutantes sencillas de las diferentes *ATG* ($\Delta atg'x'$) y de *SLM35* ($\Delta slm35$) fueron obtenidas de la colección de cepas mutantes Euroscarf (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) (Winzeler et al., 1999). Para el caso específico de las mutantes de $\Delta atg'x'$, se corroboró la delección del gen de interés y la presencia del casete de resistencia mediante la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) de punto final usando el par de oligonucleótidos específicos indicados en la Tabla 3. El oligonucleótido sentido se alinea sobre la secuencia 5' no traducida de cada gen y el oligonucleótido antisentido sobre el marco de lectura abierto. La cepa $\Delta slm35$ ya ha sido verificada previamente en nuestro laboratorio (Aguilar-Lopez et al., 2016).

En las mutantes obtenidas de la colección de cepas mutantes sencillas que tenemos disponible, el marco de lectura ha sido reemplazado por el casete de resistencia *KanMX4*. Por lo tanto, para corroborar la presencia del casete de resistencia *KanMX4*, se utilizó el oligonucleótido KanRev (Tabla 3) en lugar de los desoxinucleótidos antisentido de cada gen (Figura 7).

Tabla 3. Oligonucleótidos diseñados para comprobación de mutantes.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
ATG32F-300	ACCGTCTGTCTAGAGCATATATC	57
ATG32R+182	TAACCAAGTTCTGTCCCATTC	55.9
ATG33F-299	TGTATATTGGTCTTGGAGTTC	53.9

ATG33R+241	AGCTACAAGCATACCATAGAG	55.9
ATG1F-199	ACAGAGAACAGTACTATAGAAG	54.7
ATG1R+268	TGTTGATGTTTCGTTACAGTC	55.9
ATG8F-278	TCTACTCGAAGTGATATAGATG	54.7
ATG8R+114	TCAATCTCTGGAATATCTGAC	54
ATG11F-139	ATGGAACTATATAATAGCGATGC	55.3
ATG11R+364	TCTGTCAAGTCGTTGGAATTAG	56.5
ATG13F-119	TTACCTCACATAGATATAGAACG	55.3
ATG13R+151	ACTCACTAATTCTGAGTGATC	53.9
ATG17F-205	TTAAGTTCTTCGACCTCTCTC	55.9
ATG17R+253	CATCTCATCAACTAAGACCAC	55.9
ATG20F-285	TTGGCTTATTTGCTTACTAGC	53.9
ATG20R+289	TTAGGTTATGGCTTCTCATAC	53.9
ATG21F-318	AGAAGACCAAGATATCTTTAGAC	55.3
ATG21R+181	ATTAGTTATTAATATGCTCTCCTC	54.1
ATG24F-149	AGTATCAAGGAATTGAGAGAGG	56.5
ATG24R+548	TCTTCGTTTTGCTTGTGAACTG	56.5
KanRev	GGCACGTTCCATAGGATGGCA	63.3
HygRev	GCAATCGCGCATATGAAATC	54.0
YJR100C promotor	TTGTAAGCCTACCGGCAATAAGG	60.9
SLM35 antisentido	CTACTCATCATAGCCACCG	56.6
VN- rev	CACCATGGTGGCGATGGATC	62.5

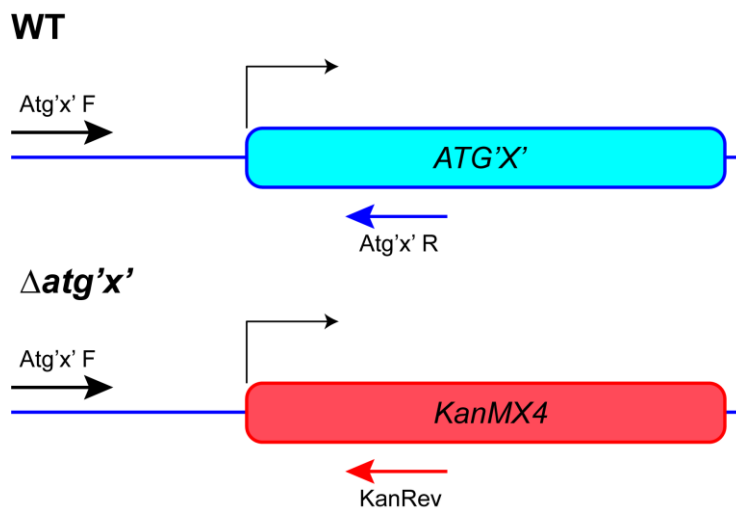


Figura 7. Las mutantes $\Delta atg'x'$ fueron corroboradas mediante PCR. El gen de interés se evaluó con un par de oligonucleótidos de los cuales el oligonucleótido sentido se alinea en la región 5' no traducida de cada gen y el oligonucleótido antisentido se alinea en el interior del marco de lectura abierto. El casete *KanMX4* se verificó utilizando el oligonucleótido sentido de cada gen y el oligonucleótido antisentido KanRev como se muestra en la figura.

7.2 Obtención de cepas dobles mutantes $\Delta atg x \Delta slm35$

Para construir las cepas con doble delección se eligió reemplazar por recombinación homóloga al marco de lectura abierto del gen *SLM35* en cada una de las mutantes $\Delta atg 'x'$ de la colección.

En primer lugar realizamos reacciones de PCR utilizando el plásmido pAG32 (Goldstein & McCusker, 1999) como templado y ocupando oligonucleótidos (Tabla 4) diseñados para reemplazar el ORF *SLM35* por el casete *HphMX* que confiere resistencia a higromicina.

Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para la delección de *SLM35*.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
YJR100C delta For	CAAAACAAAAGAAGATTAAAGGTCAAACATAA AGGATAACACCGACCGTACGCTGCAGGTTCGAC	60.7
YJR100C delta Rev	GTCAAATATGTATTTACAGAATTCTTTTAAAT ATATAATTCACATCGATGAATTCGAGCTCG	55.2

El producto amplificado durante estas reacciones se utilizó para transformar células de cada una de las cepas $\Delta atg x$ de interés (Daniel Gietz & Woods, 2002). Brevemente, se obtuvo un volumen de 1.5 mL de cultivo celular ($OD_{600}=0.7-1$) el cual fue centrifugado (8,600g, 2 minutos) y el botón celular fue lavado con agua estéril y recuperado por centrifugación en las mismas condiciones. Posteriormente, el botón celular fue tratado con acetato de litio (CH_3COOLi) 0.1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se recuperaron nuevamente y se agregaron de manera secuencial los siguientes elementos: 240 μ L de PEG 3500 50% w/v, 36 μ L de acetato de litio 1.0 M, 10 μ L de ADN de esperma de salmón 10 mg/mL, 45 μ L de la reacción de PCR y 29 μ L de agua estéril. El botón celular se resuspendió una vez que todos los componentes fueron añadidos y la reacción se sometió a un choque térmico a 42 °C durante 45 min. Las células se recuperaron y se resuspendieron en 100 μ L de agua estéril y se plaquearon en cajas de medio no selectivo YPD-G418 (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%, Geneticina G418 100 μ m/ μ L). Después de 48 h de

crecimiento a 30 °C en estas condiciones, las células se replicaron en medio selectivo YPD-G418-Hyg (extracto de levadura 1%, bactopectona 2%, glucosa 2%, geneticina G418 100 µg/mL, hygromicina 250 µg/mL).

7.3 Extracción de DNA genómico de levadura

Para corroborar las mutantes se extrajo DNA genómico de levadura (Burke, Dawson, Stearns, & Cold Spring Harbor Laboratory., 2000). De manera resumida, se tomó 1.5 mL de un cultivo líquido de 16 horas de cada cepa de interés y las células se recuperaron por centrifugación (13,200g, 1 minuto), el botón celular se lavó con agua destilada libre de nucleasas y se resuspendió en 200 µL de amortiguador de lisis (Tritón X-100 2% v/v, SDS 1% w/v, NaCl 100 mM, Tris-HCl pH 8.4 10 mM, EDTA-Na pH 8.0 1 mM), se añadieron 200 µL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y se resuspendió durante 6 minutos. Las muestras se centrifugaron a 13,200g por 5 minutos a 4°C, se recolectó la fase acuosa y se añadieron 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.3 y 3 volúmenes de etanol 96% previamente enfriado a -20°C. Dichas muestras se incubaron a -20°C durante 20 minutos, se centrifugaron a la misma velocidad y temperatura durante 10 minutos, y el botón resultante se lavó con 1 mL de etanol 70% previamente enfriado a -20°C. Finalmente se recuperó el DNA por centrifugación a la misma velocidad y temperatura durante 1 minuto, se retiró el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente antes de resuspender utilizando agua estéril libre de nucleasas (50 µL).

7.4 Cepas con las fusiones AtgX-VN

Para evaluar posibles interacciones físicas entre SIm35 y los componentes de la autofagia se utilizó el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular, usando como reportero la proteína fluorescente Venus (Sung & Huh, 2007). De manera breve, de las proteínas de interés a evaluar, una de ellas está fusionada al dominio amino terminal de Venus (VN) mientras que la segunda esta fusionada al

dominio carboxilo de Venus (VC), si existe la interacción física entre las proteínas de interés, Venus se reconstituye y emite luz a 530 nm. Las cepas AtgX-VN y SIm35-VN fueron obtenidas de la colección de cepas Bionner (Sung & Huh, 2007) y fueron corroboradas por PCR usando el oligonucleótido sentido para cada Atg y el oligonucleótido antisentido VN- rev (Tabla 3).

7.5 Generación de las cepas con la fusión SIm35-VC y Atg13-VC

Para generar las cepas con la fusión SIm35-VC y Atg13-VC se reemplazó el codón de paro de SIm35 o Atg13 mediante recombinación homóloga por la construcción VC-KanMX6 en la cepa BY4742 (*MAT α his3 Δ 1 leu2 Δ 0 lys2 Δ 0 ura3 Δ 0*). Para esto se amplificó esta construcción utilizando el plásmido pFA6a-VC-kanMX6 (Sung & Huh, 2007) usando los oligos mostrados en la Tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para la construcción SIm35-VC y Atg13-VC.

Nombre	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
SIm35-VC For	AACTGGAGGTTTCCTTTCTTTTGGCGGTGGCT ATGATGAGGGTCGACGGATCCCCGGGT	66.6
SIm35-VC Rev	AAATATGTATTTACAGAATTCTTTTAAATATA TAATTCACCTCGATGAATTCGAGCTCGTT	56.4
Atg13-VC For	AGTATTTTTTCATGAGTGATATGAACCTTTCTA AAGAAGGTGGTCGACGGATCCCCGGGT	66.6
Atg13-VC Rev	AGTATTTTTTCATGAGTGATATGAACCTTTCTA AAGAAGGTGGTCGACGGATCCCCGGGT	56.4

Las colonias obtenidas después de la transformación fueron evaluadas por PCR usando los oligonucleótidos sentido (Tabla 6) y el oligonucleótido antisentido KanRev (Tabla 3).

Tabla 6. Oligonucleótidos sentido para corroborar la construcción SIm35-VC y Atg13-VC.

Nombre	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
YJR100C promotor	TTGTAAGCCTACCGGCAATAAGG	60.9
Aim25-350 c-terminal	AGAAGGATCCACTTTTGAACC	57.4
Atg13+2113	ATAATGGGAATGATGCAGTTG	55.5

7.6 Generación de cepas diploides AtgX-VN x SIm35-VC y AtgX-VN x Atg13-VC

Una vez obtenidas las cepas con las fusiones deseadas, las cepas fueron cruzadas en medio líquido YPD. Tres días después del cruce, las células fueron plaqueadas en cajas en medio de selección sintético mínimo sin uracilo, metionina ni lisina y con geneticina (200 µg/mL). Las células que fueron capaces de crecer en este medio fueron recuperadas para posteriores experimentos.

7.7 PCR para corroboración de mutantes

Para llevar cabo la PCR con el objetivo de comprobar las mutantes, se utilizaron los siguientes reactivos:

Componente	Volumen
Oligos 10µM	1 µL (cada uno)
dNTP 10 mM	0.4 µL
Amortiguador Kapa 10X	2 µL
Agua	14.45 µL
Enzima KAPA Taq	0.15 µL
DNA	1 µL

Los ciclos de temperatura utilizados en las reacciones de PCR para corroborar el casete de resistencia *KanMX4* fueron las siguientes:

Etapa	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	
1. Desnaturalización inicial	95	10:00	
2. Desnaturalización	95	1:00	
3. Alineamiento	55	1:00	30X
4. Extensión	72	2:00	
5. Extensión final	72	8:00	

Mientras que los ciclos de temperatura utilizados en las reacciones de PCR para corroborar la presencia del casete de resistencia *HphMX* fueron las siguientes:

Etapa	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	
1. Desnaturalización inicial	95	10:00	
2. Desnaturalización	95	1:00	
3. Alineamiento	55	1:00	30X
4. Extensión	72	1:30	
5. Extensión final	72	8:00	

Los ciclos de temperatura utilizados en las reacciones de PCR para evaluar la presencia de VN en las Atg de interés y en *Slm35* fueron las siguientes:

Etapa	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	
1. Desnaturalización inicial	95	10:00	
2. Desnaturalización	95	1:00	
3. Alineamiento	55	1:00	30X
4. Extensión	72	2:00 o 3:30	
5. Extensión final	72	8:00	

Y para corroborar la presencia de la construcción *VC-KanMX6* los ciclos de temperatura utilizados fueron los siguientes:

Etapa	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	
1. Desnaturalización inicial	95	10:00	
2. Desnaturalización	95	1:00	
3. Alineamiento	55	1:00	30X
4. Extensión	72	3:00	
5. Extensión final	72	8:00	

7.8 Análisis electroforético de ácidos nucleicos

Los productos de PCR obtenidos se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% utilizando amortiguador TAE (39 mM Tris, 18 mM ácido acético, 1.3 mM EDTA, pH 8.0) y aplicando un voltaje de 100 V durante 45 minutos. El ADN se tiñó con GelRed y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta.

7.9 Ensayo de crecimiento por diluciones seriadas

Para realizar el ensayo de crecimiento por diluciones seriadas se utilizó el siguiente protocolo: se diluyeron los cultivos líquidos de 16 horas de las cepas de interés a una $OD_{600}=0.3$, después de tres horas de crecimiento, en donde los cultivos alcanzan una $OD_{600}=0.7-1$, se tomó 1.0 OD_{600} de cada cultivo y se centrifugó (8,600g, 5 minutos), se lavaron las células con agua estéril, se centrifugaron y resuspendió el botón celular en 1 mL de agua estéril y se hicieron diluciones 1:10 en agua estéril en los volúmenes indicados en la figura 8.

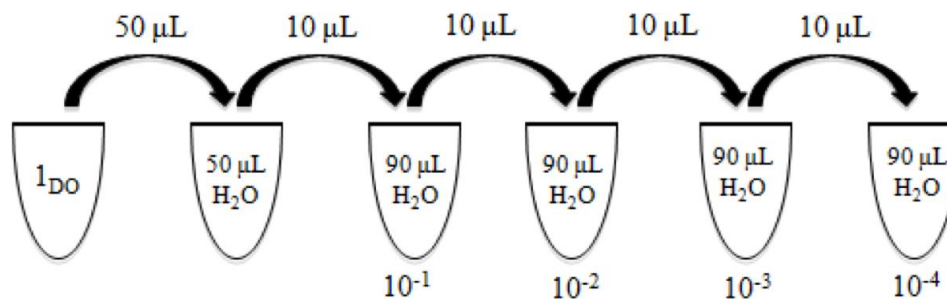


Figura 8. Diluciones realizadas para el ensayo de crecimiento.

Se tomaron 3.5 μ L de cada dilución y fueron sembrados en cajas de YPD o YPG, se incubaron durante 36 o 72 horas respectivamente a 30°C.

7.10 Caracterización de fenotipo en respuesta a estrés oxidativo

Para evaluar la respuesta de las cepas de interés al estrés oxidativo se diluyeron los cultivos líquidos de 16 horas de crecimiento de las cepas de interés a una $OD_{600}=0.3$ en un volumen de YPD=5 mL. Después de tres horas de crecimiento, en donde los cultivos alcanzan una $OD_{600}=0.7-1$, se agregaron 5.6 μ L de peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , 8.820 M) para una concentración final de 10 mM, se dejó el estrés durante 3 horas, para continuar con el ensayo de crecimiento por diluciones seriadas.

7.11 Microscopía confocal

Las células diploides con las fusiones AtgX-VN x SIm35-VC y AtgX-VN x Atg13-VC fueron cultivadas en medio YPD toda la noche, se recuperó 1 OD_{600} de células, se centrifugaron (8,600g, 2 minutos), luego fueron lavadas con agua desionizada y centrifugadas posteriormente. Finalmente se resuspendieron en 200 μ L de agua, se tomaron 5 μ L de suspensión celular y se sembraron en portaobjetos. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 800 (Unidad de Imagenología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM) usando una longitud de onda de excitación de 510 nm y una onda de emisión de 528 nm.

7.12 Ensayo de autofagia por estrés oxidativo

Las mutantes sencillas y dobles fueron transformadas con el plásmido GFP-Atg8 (pRS316-GFP-ATG8) (K. Suzuki et al., 2001), el cual tiene la proteína verde fluorescente (GFP) fusionada al N-terminal de Atg8, esta construcción ha sido ampliamente usada como reportero de autofagia. Las células se crecieron en medio SD completo –Ura toda la noche, al día siguiente se diluyó el cultivo a una

OD₆₀₀=0.3, se dejó crecer el cultivo durante tres horas, en este momento las células fueron estimuladas con 0.48 µL Ter Butil Hidroperóxido (tBOOH, 7.8 M) para una concentración final de 0.75 mM. Se dejó el estrés durante tres horas y finalmente se recuperaron proteínas totales de cada cultivo evaluado.

7.13 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales se realizó a partir de 2 OD₆₀₀ de cultivo celular, las células fueron centrifugadas a 8,600g por 2 minutos, luego fueron lavadas con agua desionizada y centrifugadas. Posteriormente las células fueron incubadas con Tris 50 mM pH 8 (250 µl) y con 50 µl de solución de lisis (NaOH 1.85 N, β-Mercaptoetanol 7.4% v/v, PMSF 20 mM, agua) y mantenidas en hielo durante 10 minutos. Las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético 12% p/v durante 30 minutos a -20°C. Las muestras fueron centrifugadas a 18,200g por 30 minutos a 4°C, y posteriormente lavadas con acetona previamente enfriada a -20°C y centrifugadas en las mismas condiciones. Finalmente las proteínas fueron resuspendidas en 100 µL de amortiguador de carga LAE 2X (SDS 4% w/v, glicerol 20% v/v, β-Mercaptoetanol 10% v/v, azul de bromofenol 0.04% w/v, Tris HCl 240 mM pH 6.8) (LAEMMLI, 1970).

7.14 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas fueron separadas por su masa molecular en condiciones desnaturizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 17.5%. Se cargaron 15 µL (0.3 OD₆₀₀) de muestra en una cámara de electroforesis vertical con amortiguador de corrida (Glicina 192 mM, Tris HCl 25 mM pH 8.4, SDS 0.1% w/v) (LAEMMLI, 1970). Los geles se corrieron a 120 V y 35 mA por gel durante 2 horas a temperatura ambiente.

	Gel de corrida	Gel de apilamiento
Acrilamida 30%, Bisacrilamida 0.2% (mL)	3.1	0.32
Tris 1.875 M pH 8.8 (mL)	1.16	
Tris 0.6 M pH 6.8 (mL)		0.2
Agua (mL)	1.16	1.44
SDS 10 % (μL)	55.66	20
AMPS 10% (μL)	33.3	10
TEMED (μL)	3.3	2

7.15 Electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa

Una vez realizada la electroforesis en SDS-PAGE, las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa, en un cámara húmeda con amortiguador de transferencia (Glicina 192 mM, Tris 25 mM pH 8.4, SDS 0.1% w/v, metanol 20% v/v) a 120 V y 380 mA durante 1 hora a 4°C (Bolt & Mahoney, 1997). Posteriormente las membranas fueron teñidas con Rojo de Ponceau (Rojo de Ponceau 0.2% w/v, ácido acético 1% v/v) para evaluar la transferencia de las proteínas.

7.16 Detección por quimioluminiscencia

Las membranas de nitrocelulosa fueron bloqueadas con solución de bloqueo (TBS-Leche semidescremada 5% p/v) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos correspondientes diluidos en la misma solución de bloqueo según las condiciones mostradas en la Tabla 7. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia utilizando el sistema Immobilon Western Chemiluminiscent HRP Substrate (Millipore), y las membranas fueron expuestas a una película Biomax XAR (Kodak).

Tabla 7. Anticuerpos y condiciones de uso para la inmunodetección.

Anticuerpo	Dilución	Tiempo y temperatura de incubación
α-GFP (LifeSpan BioSciences, Inc.)	1:1000	Toda la noche, 4°C
α-Hog1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)	1:5000	Toda la noche, 4°C
α-IgG (Roche)	1:5000	2 horas, 4°C

8 Resultados

8.1 Caracterización del fenotipo de crecimiento en condiciones estándar de laboratorio de las cepas $\Delta atg'x'$ y $\Delta atgx\Delta slm35$

Para evaluar el papel de Slm35 dentro de la maquinaria autofágica se realizó un búsqueda en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database (<https://www.yeastgenome.org/>) de proteínas Atg'x' que participan en diferentes etapas de la autofagia general, de la autofagia selectiva y en diferentes tipos de autofagia selectiva (mitofagia, vía Cvt y pexofagia). En particular se buscó que el fenotipo de autofagia y mitofagia estuvieran alterados en las mutantes nulas de los genes de interés y que estas mutantes nulas no fueran letales. Las Atg'X' que se seleccionaron fueron las siguientes (Figura 9):

- **Autofagia general:** Atg1, Atg13, Atg17 y Atg8.
- **Autofagia selectiva:** Atg11, Atg20, Atg21 y Atg24.
- **Tipos de autofagia selectiva:** Atg32 y Atg33 (Mitofagia), Atg19 (vía Cvt) y Atg36 (Pexofagia).

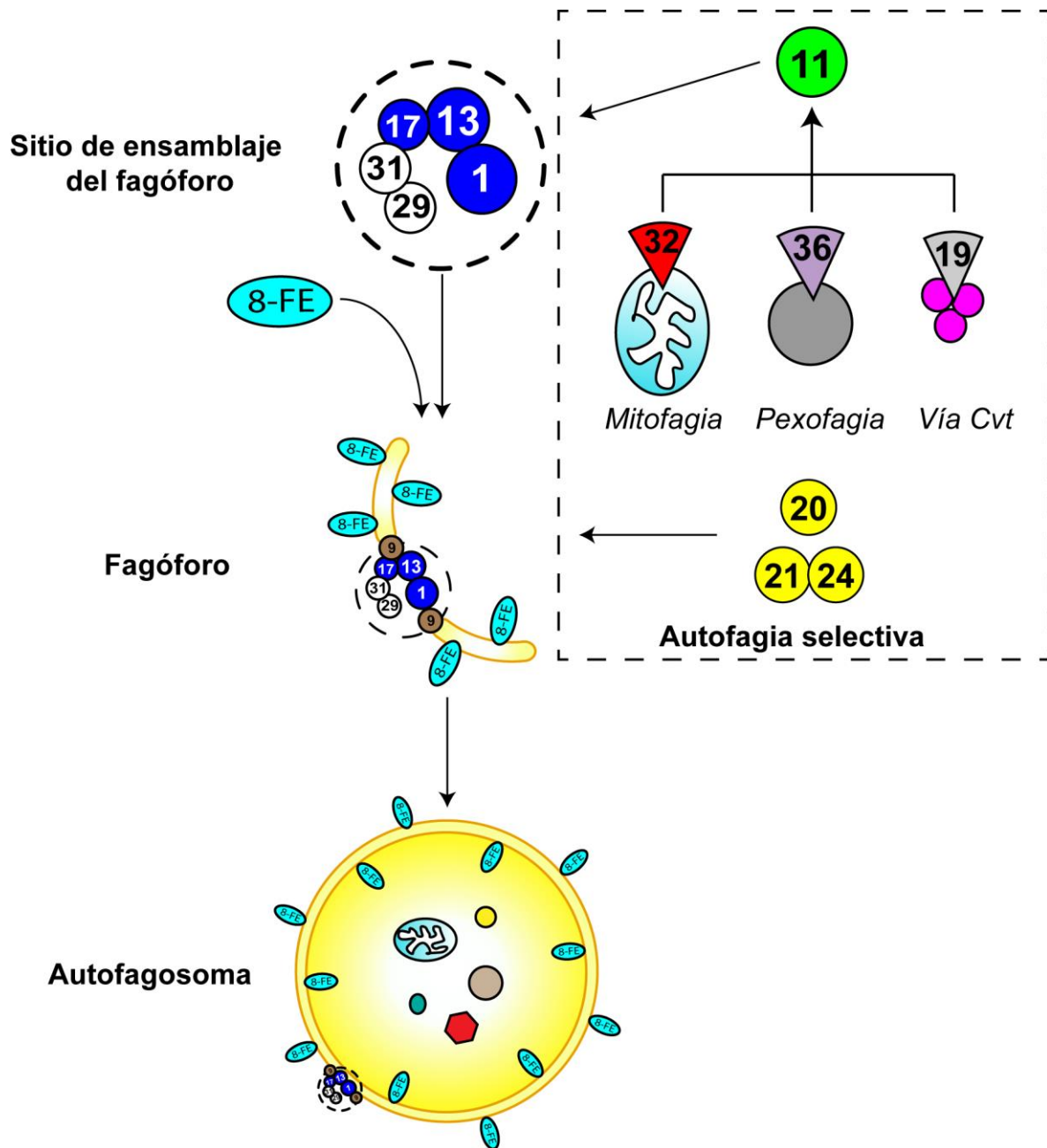


Figura 9. Las Atg seleccionadas para este trabajo desarrollan diferentes papeles durante el proceso de autofagia. Atg1, Atg13 y Atg17 son necesarios para el sitio de ensamblaje del fagóforo y Atg8 es necesaria para la expansión y el cierre del fagóforo. Atg20, Atg21 y Atg24 son proteínas involucradas en la expansión del fagóforo pero solo en autofagia selectiva. Atg11 es la encargada de acoplar los receptores específicos de autofagia con el sitio de ensamblaje del fagóforo y Atg32, Atg36 y Atg19 son los receptores específicos de mitofagia, pexofagia y la Vía Cvt, respectivamente.

En primer lugar, se caracterizó el fenotipo de crecimiento de las cepas sencillas $\Delta atgx$ y de las dobles mutantes $\Delta atgx\Delta slm35$ en condiciones estándar de laboratorio comparándolas con la cepa silvestre (BY4741) y la cepa $\Delta slm35$. Para ello utilizamos el ensayo de crecimiento por diluciones seriadas sobre medio sólido (Materiales y Métodos). Comenzamos por observar el fenotipo de crecimiento en medio rico fermentativo (YPD) o respiratorio con el objetivo de evaluar la función mitocondrial (YPG). En estos experimentos se observó que a la temperatura óptima de crecimiento (30°C) no existen diferencias entre las cepas evaluadas en los medios utilizados. Esto implica que el metabolismo fermentativo o la función mitocondrial no se encuentra alterada en estas mutantes (Figura 10). Cabe mencionar que la cepa $\Delta slm35$ presenta un crecimiento ligeramente mejor a 37°C respecto a la cepa WT en el medio respiratorio, este dato concuerda con lo encontrado en el laboratorio respecto al fenotipo de resistencia de esta mutante al estrés térmico (Figura 10) (Aguilar-Lopez et al., 2016).

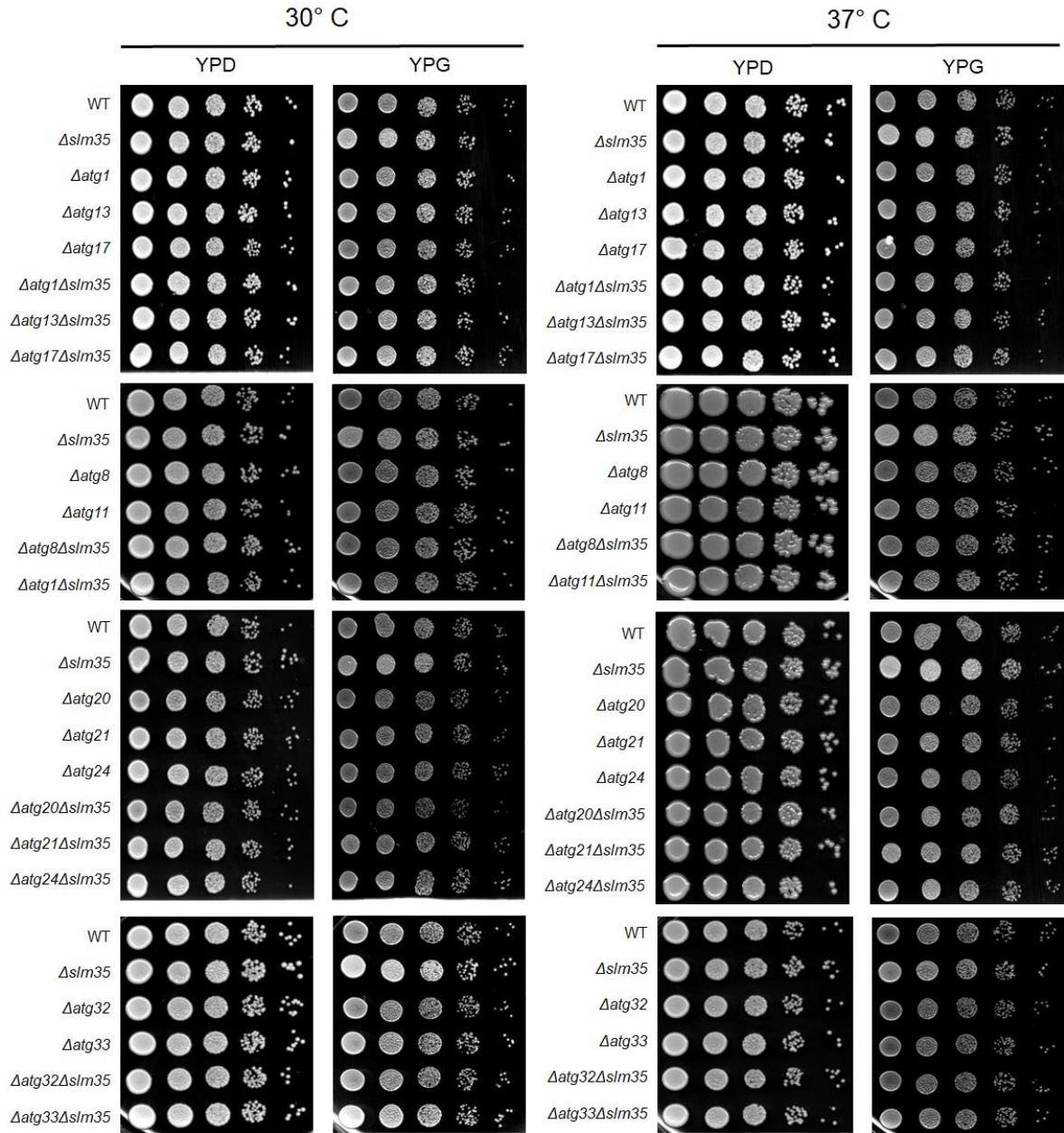


Figura 10. Fenotipo de crecimiento de las cepas $\Delta atgx$ y $\Delta atgx\Delta slm35$. Se muestra el crecimiento de las cepas obtenidas en medio fermentativo YPD o respiratorio YPG a 30°C y 37°C

8.2 Estandarización de las condiciones de estrés oxidativo

Para estandarizar las condiciones de estrés oxidativo que se utilizarían para evaluar las interacciones genéticas entre los genes *ATGX* y *SLM35*, se analizó el fenotipo de crecimiento de las cepas silvestre (WT) y $\Delta slm35$ después de aplicar

concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por 3 horas (ver Materiales y Métodos) (Figura 11).

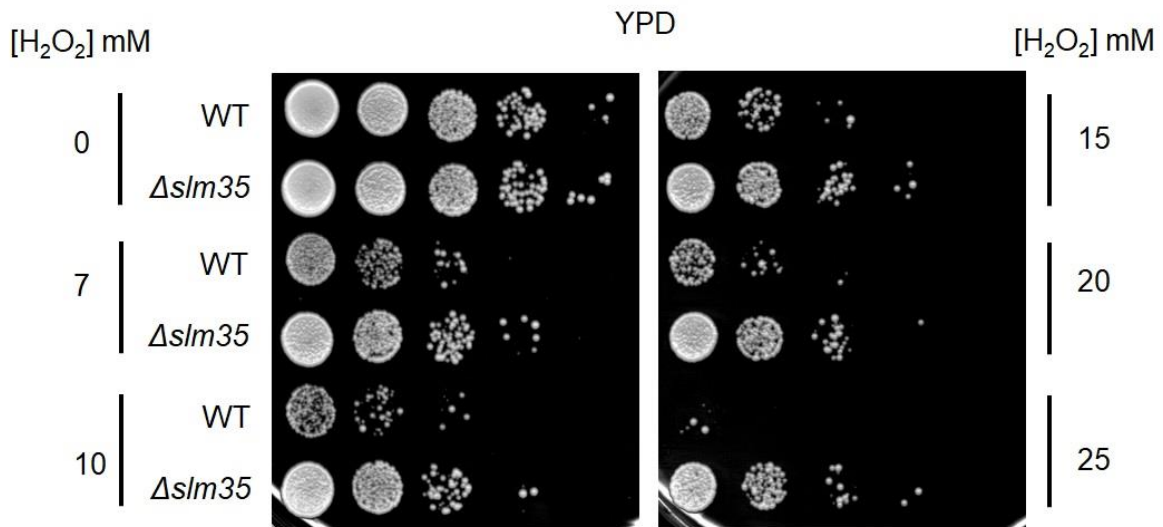


Figura 11. Estandarización de las condiciones de estrés oxidativo. Se muestra el crecimiento por diluciones seriadas de las cepas WT y $\Delta slm35$ después de aplicar un estrés por peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en las condiciones indicadas.

Al realizar este experimento, observamos que a partir de la concentración de 7 mM de H_2O_2 la cepa WT ya presenta sensibilidad al estrés, además de que se ve el fenotipo de resistencia al estrés oxidativo en la cepa $\Delta slm35$. El fenotipo de estas cepas se conserva a concentraciones crecientes de H_2O_2 . La cepa WT ya no es viable a la concentración de 25 mM de H_2O_2 mientras que la cepa $\Delta slm35$ si lo es. Con los resultados obtenidos se eligió la concentración de 10 mM de H_2O_2 para continuar con la caracterización fenotípica de las cepas de interés, ya que a esta concentración se observa una disminución significativa en el crecimiento de la cepa silvestre sin que comprometa completamente la viabilidad, y al mismo tiempo se presenta el fenotipo de resistencia a estrés oxidativo característico de la cepa $\Delta slm35$ (Aguilar-Lopez et al., 2016).

8.3 Caracterización del fenotipo y el proceso de autofagia en las cepas $\Delta atgx$ y $\Delta atgx\Delta slm35$ en condiciones de estrés oxidativo

Una vez estandarizado el protocolo de estrés oxidativo, aplicamos estas condiciones en las cepas de nuestro interés y evaluamos el fenotipo de crecimiento y el proceso de autofagia general.

8.3.1 Los pasos iniciales de la formación y expansión del fagóforo (PAS) son necesarios para que la ausencia de SLM35 confiera resistencia a estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno

Para averiguar si el gen *SLM35* presenta una interacción genética con componentes de la autofagia general, generamos las mutantes dobles $\Delta atgx\Delta slm35$ a partir de las mutantes sencillas $\Delta atg1$, $\Delta atg13$, $\Delta atg17$ y $\Delta atg8$, y evaluamos su fenotipo de crecimiento en condiciones de estrés oxidativo. Las cepas $\Delta atg1$, $\Delta atg13$, $\Delta atg17$ y $\Delta atg8$ presentan un fenotipo similar a la WT, es decir, las mutantes son sensibles al estrés por H_2O_2 . Las dobles mutantes revierten la resistencia que se presenta al eliminar el gen $\Delta slm35$ (Figura 12).

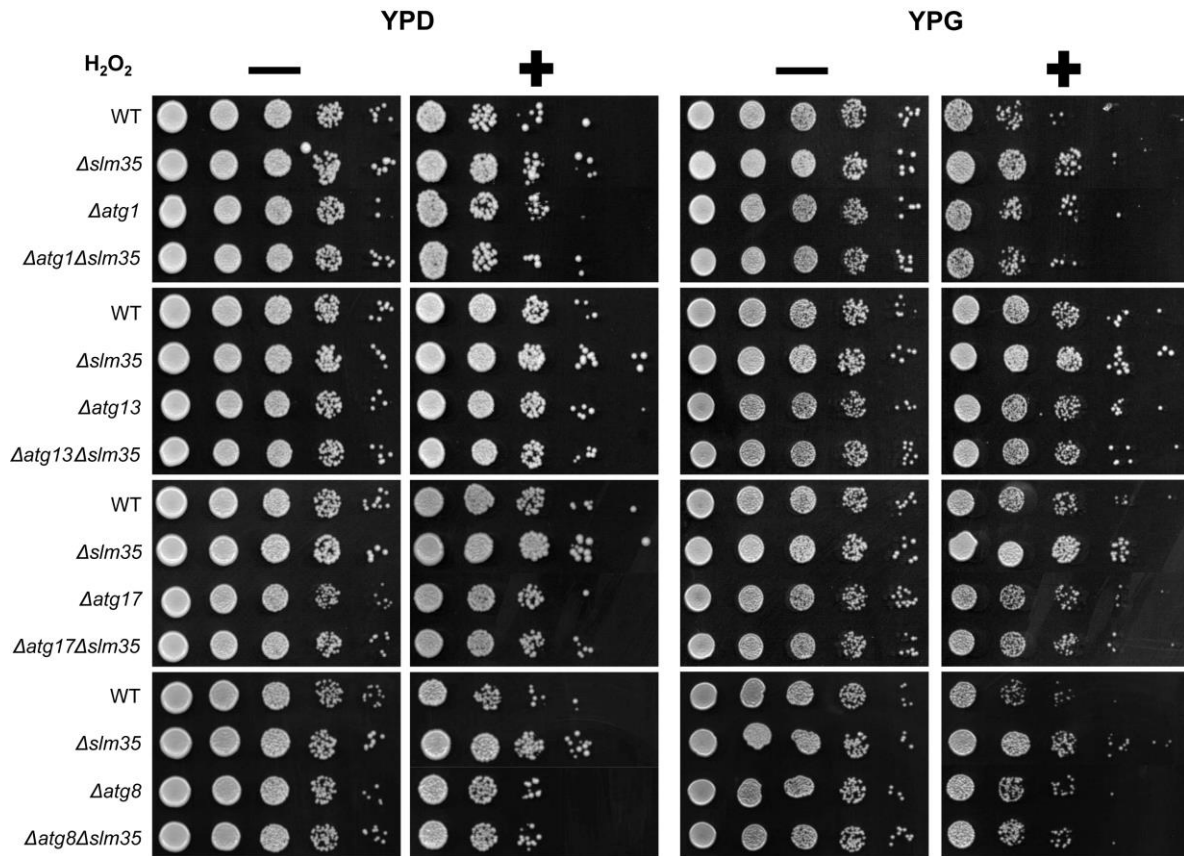


Figura 12. El fenotipo de la $\Delta slm35$ de resistencia a estrés oxidativo depende del proceso de autofagia general. Las cepas indicadas fueron tratadas por 3 horas con 10 mM de H_2O_2 (+) antes de realizar diluciones seriadas y colocarlas sobre medio rico fermentativo YPD, 36 horas o respiratorio YPG, 72 horas.

Estos resultados sugieren que el fenotipo resistente a estrés oxidativo que se presenta en ausencia del gen *SLM35* depende del proceso de autofagia general y en particular del ensamblaje del fagóforo en donde participan las proteínas Atg1, Atg13 y Atg17.

La autofagia es un proceso de respuesta a diferentes tipos de estrés a los cuales las células son sometidas. Se sabe que el estrés oxidativo es un inductor de autofagia, de mitofagia y especialmente de pexofagia (Lee, Giordano, & Zhang, 2012; X. Wang, Li, Liu, & Ma, 2015). Con el objetivo de evaluar si en la cepa $\Delta slm35$ el proceso de autofagia general se ve afectado en condiciones de estrés oxidativo y cuál es la influencia de eliminar simultáneamente al gen *SLM35* y a los

genes *ATG* relacionados con la formación del sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS), se utilizó como reportero a la proteína Atg8 fusionada en el extremo N-terminal a la proteína verde fluorescente (GFP-Atg8). Esta proteína de fusión, al ser degradada en la vacuola vía autofagia, se separa y la GFP es resistente a la hidrólisis vacuolar, por lo que permanece libre y estable, haciendo posible su detección mediante replicas tipo Western Blot. A mayor cantidad de GFP libre, mayor autofagia (Figura 13) (Delorme-Axford, Guimaraes, Reggiori, & Klionsky, 2015).

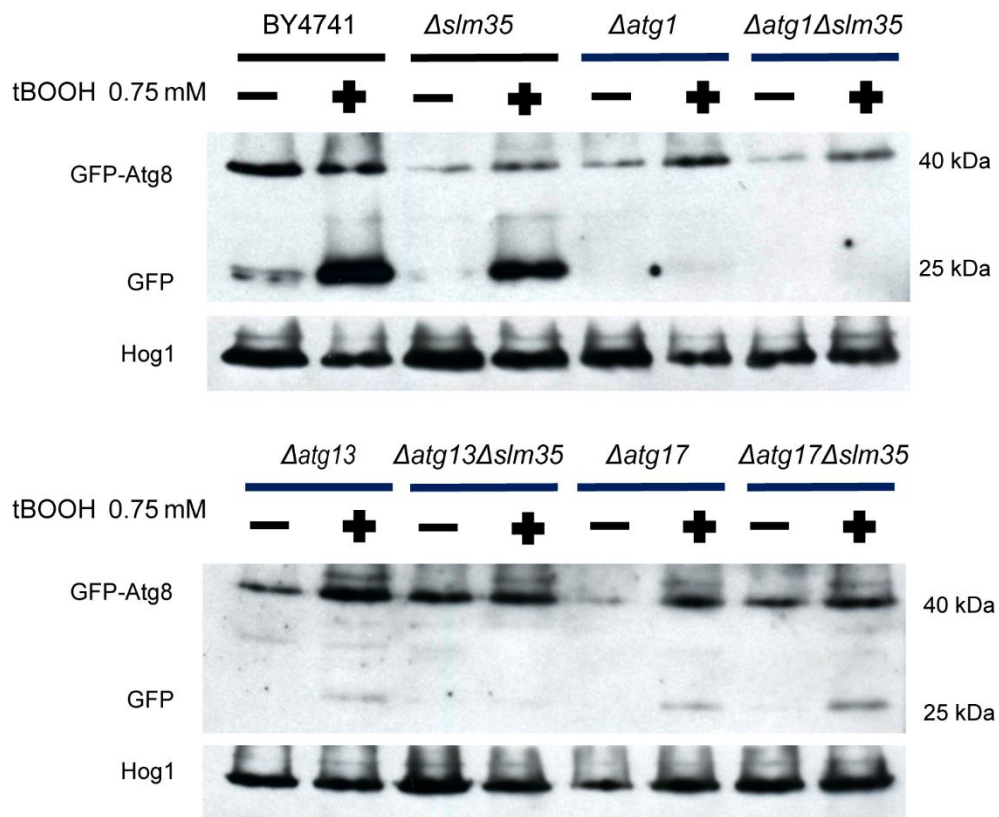


Figura 13. El estrés oxidativo induce el proceso de autofagia en la cepa $\Delta slm35$. La autofagia fue evaluada haciendo uso del reportero GFP-Atg8, en donde debido al proceso de autofagia la GFP se separa de Atg8 y permanece estable y fue detectada mediante Western Blot. Las cepas indicadas fueron tratadas con tBOOH a una concentración final de 0.75 mM durante tres horas para inducir estrés oxidativo. Este estímulo provoca un aumento en la banda de GFP libre (25 kDa) en la cepa BY4741 y $\Delta slm35$, y este aumento es dependiente de las proteínas que participan en el ensamblaje y expansión del fagóforo.

Para inducir autofagia se usó Ter Butil Hidroperóxido (tBOOH) a una concentración de 0.75 mM. El tBOOH se ha comprobado como un excelente inductor de estrés oxidativo además de presentar una alta estabilidad (Mulford & Fassler, 2011). En nuestro laboratorio se ha observado que una exposición de 24 horas de H₂O₂ compromete la viabilidad celular pero no así el tBOOH (Tesis de maestría Romo Casanueva 2018).

La condición de estrés oxidativo provocada por la exposición durante tres horas tBOOH 0.75 mM induce el proceso de autofagia, ya que se observa un aumento en la banda de GFP libre tanto en la cepa silvestre como en la $\Delta slm35$. Este resultado indica que el proceso de autofagia se lleva a cabo de manera normal en esta cepa (Figura 13).

En la cepa $\Delta atg1$ no se observó la banda libre de GFP después del estrés oxidativo, lo que sugiere una total ausencia del proceso de autofagia en esta cepa. Sin embargo, en las cepas $\Delta atg13$ y $\Delta atg17$ hay una drástica disminución en la banda de GFP libre, por lo que la autofagia esta considerablemente disminuida pero no totalmente en estas cepas (Figura 13).

En la doble mutante $\Delta atg1\Delta slm35$ no se observó la banda correspondiente a la GFP libre, por lo que la autofagia esta abatida en esta cepa. Al analizar el proceso en las cepas, $\Delta atg13\Delta slm35$ y $\Delta atg17\Delta slm35$ se observó que la banda de GFP libre disminuyó de manera dramática, por lo que fue posible confirmar que la aparición de GFP libre en las cepas silvestre y $\Delta slm35$ se debe al proceso de autofagia general (Figura 13).

Es importante mencionar que no fue posible analizar el flujo autofágico en las cepas $\Delta atg8$ y $\Delta atg8\Delta slm35$ ya que el reportero GFP-Atg8 utilizado en este tipo de experimentos complementa la función en ausencia del gen *ATG8*. Es decir, los resultados obtenidos recuperan el flujo autofágico de una cepa silvestre y una $\Delta slm35$, respectivamente.

8.3.2 La autofagia general se ve afectada al eliminar simultáneamente a los genes *ATG11* y *SLM35*, por lo tanto se pierde el fenotipo de resistencia a estrés de la cepa $\Delta slm35$

Para continuar explorando las relaciones funcionales entre *SLM35* y los componentes involucrados en el proceso de autofagia, decidimos explorar si existen interacciones genéticas con *ATG11*, cuyo producto proteico participa como proteína de andamiaje de la carga con el PAS en todos los tipos de autofagia selectiva (Figura 14).

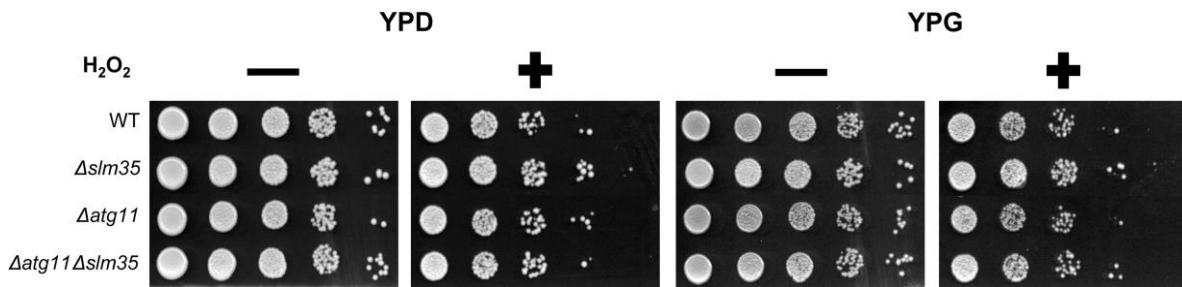


Figura 14. La resistencia a estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ depende de la autofagia selectiva. Las cepas indicadas fueron tratadas con H_2O_2 (+) 10 mM durante 3 horas, luego se realizaron diluciones seriadas y fueron sembradas en medio rico fermentativo YPD, 36 horas o respiratorio YPG, 72 horas.

De la misma manera que se observó para los componentes de autofagia general, la mutante sencilla $\Delta atg11$ muestra un fenotipo sensible al estrés por H_2O_2 similar al de la cepa silvestre. Asimismo, la eliminación simultánea de los genes *SLM35* y *ATG11* ($\Delta atg11\Delta slm35$) compromete la resistencia de la mutante $\Delta slm35$. Nuestros resultados muestran nuevamente que el fenotipo de resistencia a estrés oxidativo que se produce al eliminar al gen *SLM35* depende del receptor general para la autofagia selectiva Atg11.

A continuación evaluamos el flujo autofágico utilizando el reportero GFP-Atg8 en las mutantes sencillas $\Delta atg11$ y $\Delta slm35$ así como en la mutante doble $\Delta atg11\Delta slm35$ (Figura 15).

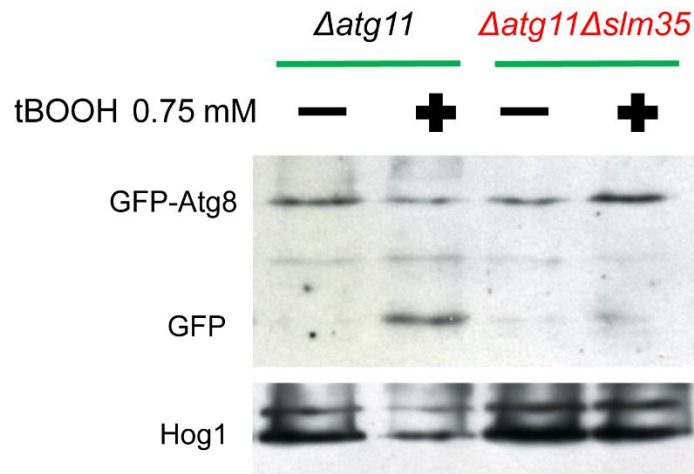


Figura 15. La ausencia simultanea de Slm35 y Atg11 comprometen la autofagia general en condiciones de estrés oxidativo. Las cepas indicadas fueron tratadas con tBOOH 0.75 mM durante tres horas, luego se realizó un Western Blot contra GFP para evaluar el proceso de autofagia. En la doble mutante *Δatg11Δslm35* el proceso de autofagia se ve disminuida en respuesta a estrés oxidativo, sugiriendo una relación funcional de Atg11 y Slm35 en el proceso de autofagia.

En la cepa *Δatg11* se observa que la autofagia se induce en respuesta a estrés oxidativo de manera similar a lo que ocurre en la cepa silvestre (Figura 13 y 15). En cambio, en la doble mutante *Δatg11Δslm35* la autofagia se ve comprometida ya que la señal de GFP libre desaparece casi por completo. Estos resultados nos permiten concluir que la eliminación simultánea de *SLM35* y *ATG11* genera defectos en el proceso de autofagia general en respuesta a estrés oxidativo y que los defectos en el crecimiento de la doble mutante *Δatg11Δslm35* se debe a la ausencia de autofagia general y no de autofagia selectiva como se pensó inicialmente.

8.3.3 La función de Slm35 durante la resistencia a estrés oxidativo requiere de la formación del fagóforo durante la autofagia selectiva dependiente de los genes *ATG20*, *ATG21* y *ATG24*

Ya que los resultados obtenidos con las cepas *Δatg11* y *Δatg11Δslm35* no permitieron concluir sobre el proceso de autofagia selectiva, evaluamos a continuación la relación genética entre *SLM35* y los genes involucrados en la

expansión del fagóforo durante la autofagia selectiva (*ATG20*, *ATG21* y *ATG24*). En primer lugar tomamos a las mutantes sencillas $\Delta atg20$, $\Delta atg21$ y $\Delta atg24$, así como las dobles mutantes con *SLM35* y evaluamos el fenotipo en condiciones de estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (Figura 16).

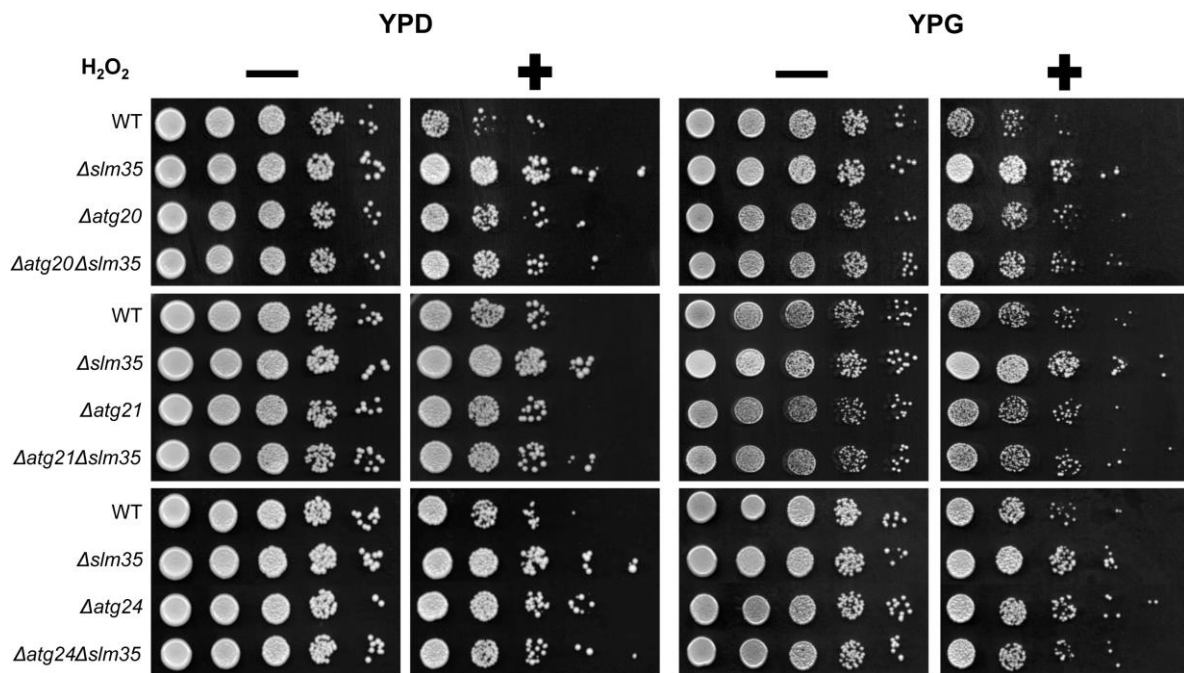


Figura 16. El fenotipo de la $\Delta slm35$ de resistencia a estrés oxidativo depende de los elementos involucrados en la expansión del fagóforo en la autofagia selectiva. Las cepas $\Delta atgx$ y $\Delta atgx\Delta slm35$ fueron tratadas con el H_2O_2 (+) durante 3 horas, posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio YPD 36 horas y YPG 72 horas.

Tal y como se observó previamente para los otros genes *ATGX* estudiados, la sensibilidad al estrés oxidativo de las mutantes sencillas $\Delta atg20$ y $\Delta atg21$, así como de las dobles mutantes $\Delta atg20\Delta slm35$ y $\Delta atg21\Delta slm35$ fue similar al de la cepa silvestre (Figura 16). Por otro lado, la cepa $\Delta atg24$ muestra un fenotipo resistente a estrés, y la doble mutante $\Delta atg24\Delta slm35$ presenta un fenotipo intermedio entre la cepa WT y las mutantes sencillas. Estos resultados permiten concluir que el fenotipo de resistencia característico de la cepa $\Delta slm35$ depende

del proceso de autofagia selectiva y en particular de la expansión del fagóforo mediada por Atg20, Atg21.

A continuación analizamos si la ausencia de estos componentes específicos de autofagia selectiva compromete el flujo de autofagia general en condiciones de estrés oxidativo (Figura 17). Cabe mencionar que este proceso particular en nuestras condiciones experimentales ha sido poco estudiado. En las cepas $\Delta atg20$, $\Delta atg24$, $\Delta atg20\Delta slm35$ y $\Delta atg24\Delta slm35$ observamos que el proceso de autofagia, indicada por la banda de GFP libre, no se encuentra alterada. Este es un resultado esperado debido a que Atg20 y Atg24 participan de manera puntual en procesos de autofagia selectiva, sin embargo no explica el crecimiento después de un estrés oxidativo (Figura 16).

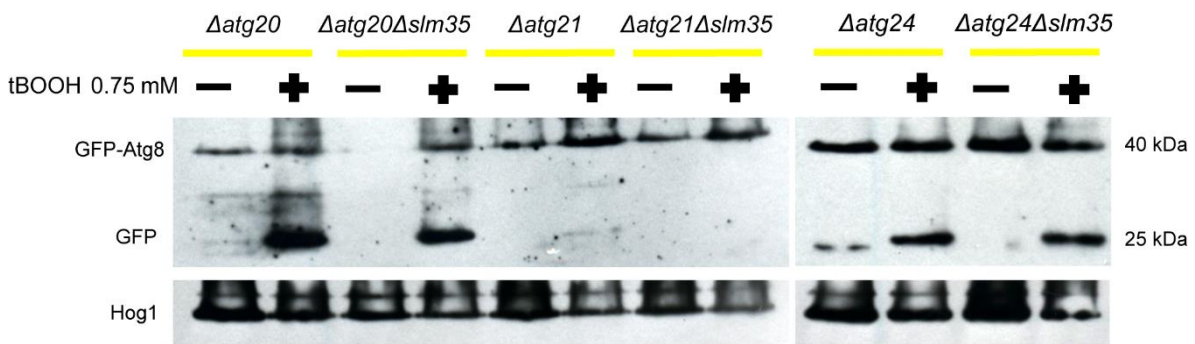


Figura 17. La ausencia de Atg21 bloquea la autofagia en respuesta a estrés oxidativo. Las cepas indicadas fueron tratadas con tBOOH 0.75 mM durante tres horas, luego se realizó un Western Blot contra GFP para evaluar el proceso de autofagia. En la cepa $\Delta atg21$ no se observa presencia de GFP libre, lo que indica un papel importante de Atg21 para la autofagia general en la respuesta a estrés oxidativo. En el resto de las mutantes sencillas y dobles la autofagia no se ve alterada debido a que estas Atgs participan en la autofagia selectiva.

Por otro lado, el estrés oxidativo no induce autofagia en la cepa $\Delta atg21$ lo que indica que Atg21 es un elemento esencial en la autofagia general para la respuesta a estrés oxidativo. La eliminación adicional de *SLM35* en la doble mutante $\Delta atg21\Delta slm35$ no altera la ausencia del flujo autofágico de la mutante sencilla $\Delta atg21$ (Figura 17). El papel esencial de Atg21 en la autofagia general durante la respuesta a estrés oxidativo no se ha reportado anteriormente.

8.3.4 La resistencia al estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ depende de la mitofagia y de la vía Cvt pero no de pexofagia

De acuerdo con los resultados anteriores, se infiere que la resistencia a estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ depende del proceso de autofagia selectiva. Para determinar qué proceso de autofagia selectiva (mitofagia, vía Cvt o pexofagia) es responsable de la pérdida de la resistencia se construyeron cepas en donde se eliminó a los receptores de mitofagia *ATG32* y *ATG33*; a *ATG19* de la vía Cvt; y a *ATG36* que participa en pexofagia, en presencia o ausencia del gen *SLM35* y se analizó el crecimiento en condiciones normales o después de aplicar un estrés oxidativo con H_2O_2 (Figura 18).

El crecimiento de las mutantes sencillas $\Delta atg32$, $\Delta atg33$ y $\Delta atg19$ fue similar al de la cepa silvestre, es decir son sensibles al estrés por el H_2O_2 . En cambio la cepa $\Delta atg36$ mostró un fenotipo de resistencia al estrés, similar al observado en la cepa $\Delta slm35$. Además, el fenotipo de las mutantes sencillas se mantiene en cada una de las mutantes dobles y en la mutante triple (Figura 18). Con estos resultados podemos sugerir que el fenotipo de resistencia a estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ es dependiente de la mitofagia ($\Delta atg32$ y $\Delta atg33$) y de la vía Cvt ($\Delta atg19$), pero independiente de la pexofagia ($\Delta atg36$).

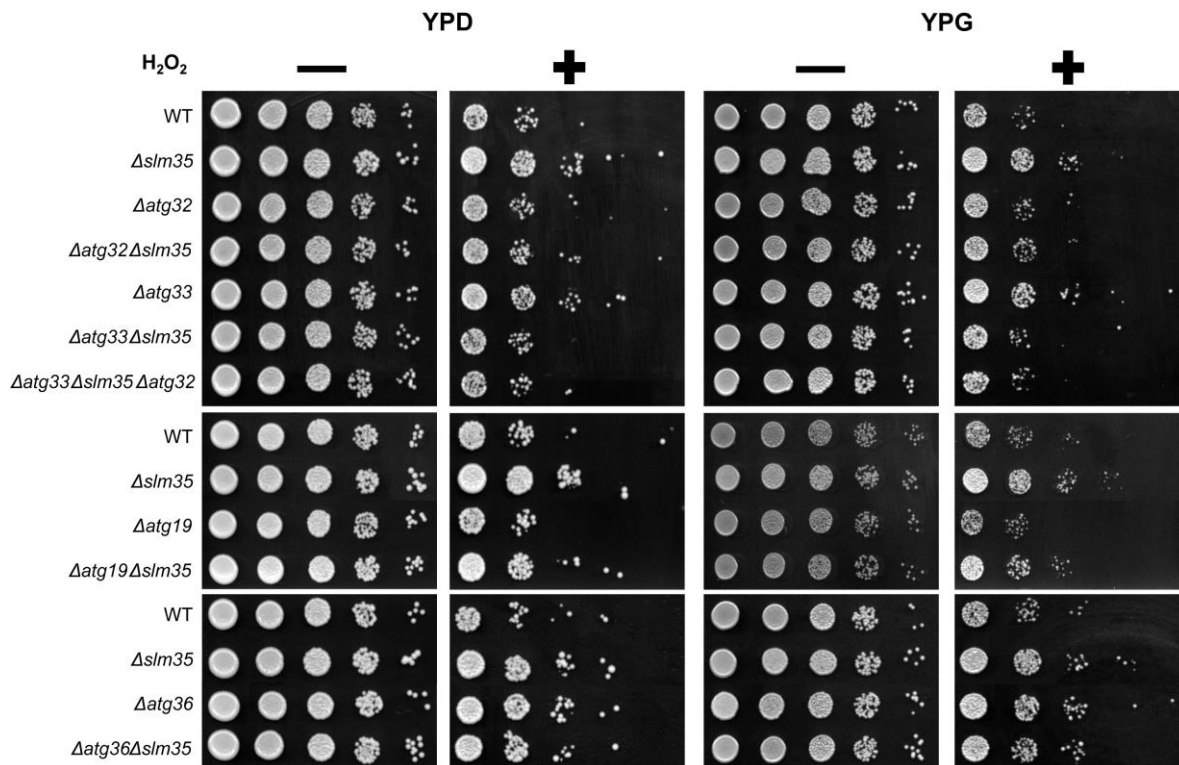


Figura 18. La mitofagia y la vía Cvt son importantes para el fenotipo de resistencia a estrés de la cepa $\Delta slm35$. Las cepas $\Delta atgx$ y $\Delta atgx\Delta slm35$ fueron tratadas con el H_2O_2 (+) durante 3 horas, posteriormente se realizaron diluciones seriadas y se sembraron en medio YPD 36 horas y YPG 72 horas.

8.3.5 Los receptores específicos de autofagia y *Slm35* no participan en el proceso de autofagia general en condiciones de estrés oxidativo

Finalmente evaluamos si la autofagia general se ve afectada en ausencia de los distintos receptores específicos de autofagia, Atg32, Atg33, Atg19 y Atg36 y en la ausencia simultánea de *Slm35* (Figura 19).

Nuestros resultados muestran que la ausencia independiente de cada uno de los receptores específicos de autofagia no afecta la autofagia general, lo que concuerda con resultados publicados anteriormente (Kanki & Klionsky, 2009; Motley, Nuttall, & Hettema, 2012; Scott, Guan, Hutchins, Kim, & Klionsky, 2001; Yen et al., 2009). La eliminación simultánea de *SLM35* tampoco afecta al proceso autofágico, lo que indica que tanto los receptores específicos de autofagia como *Slm35* no participan en el proceso de autofagia general.

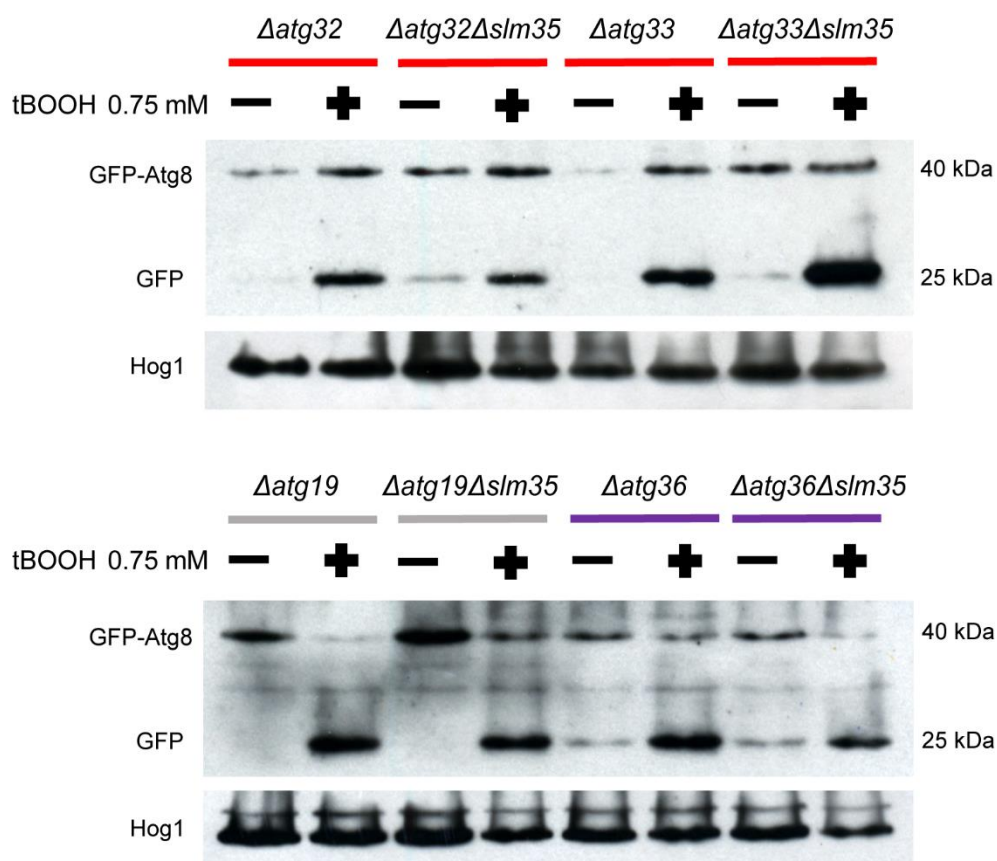


Figura 19. La ausencia independiente de los receptores específicos de autofagia o en ausencia simultanea de Slm35 no afecta la autofagia. Las cepas indicadas fueron tratadas con tBOOH 0.75 mM durante tres horas, luego se realizó un Western Blot contra GFP para evaluar el proceso de autofagia. En las mutantes sencillas y dobles no se observó alterada en condiciones de estrés oxidativo. Lo que indica que la ausencia de los receptores de autofagia selectiva y Slm35 no modifica la autofagia general.

8.4 El ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular no fue exitoso para evaluar interacciones físicas de nuestro interés

Para evaluar posibles interacciones físicas entre Slm35 con las proteínas AtgX de interés, adoptamos el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular utilizando a la proteína fluorescente Venus como reportero (Sung & Huh, 2007). Brevemente, este ensayo se basa en la utilización de fragmentos de la proteína fluorescente reportera y fusionarlos por separado a las dos proteínas de las que se quiere evaluar la interacción. De esta manera, si existe una interacción física entre las proteínas de interés, Venus se reconstituye y se observarán señales

fluorescentes al analizar las muestras con un microscopio de fluorescencia. Como control positivo decidimos analizar las interacciones entre Atg1 y Atg13, y Atg17 y Atg13 ya que estas interacciones físicas han sido previamente reportadas mediante inmunoprecipitación (Yamamoto et al., 2016). Por lo tanto, realizamos las siguientes construcciones cada una con un dominio diferente de la proteína Venus: Atg1-VN, Atg13-VC; Atg17-VN, Atg13-VC. Como un segundo control positivo tomamos a las proteínas Ssb2-VN y SIm35-VC, cuya interacción también ya ha sido reportada previamente (Willmund et al., 2013; Yamamoto et al., 2016).

Después de construir las cepas mutantes correspondientes y verificarlas por PCR (Ver Materiales y Métodos), se crecieron en medio rico fermentativo YPD hasta alcanzar la fase estacionaria (16 horas, 30°C) para aumentar la probabilidad de encontrar focos fluorescentes y se analizaron mediante microscopía confocal (Zeiss LSM 800). En estas condiciones, no fue posible observar ninguna fluorescencia en las cepas control. La única señal fluorescente observada correspondía a la mostrada por células con morfología anormal y que podrían corresponder con células en proceso de muerte celular. Cabe mencionar que este tipo de señal también fue observada al visualizar cepas que contenían uno sólo de los dominios de Venus, es decir cepas consideradas como control negativo, confirmando la inespecificidad de la señal (Figura 20).

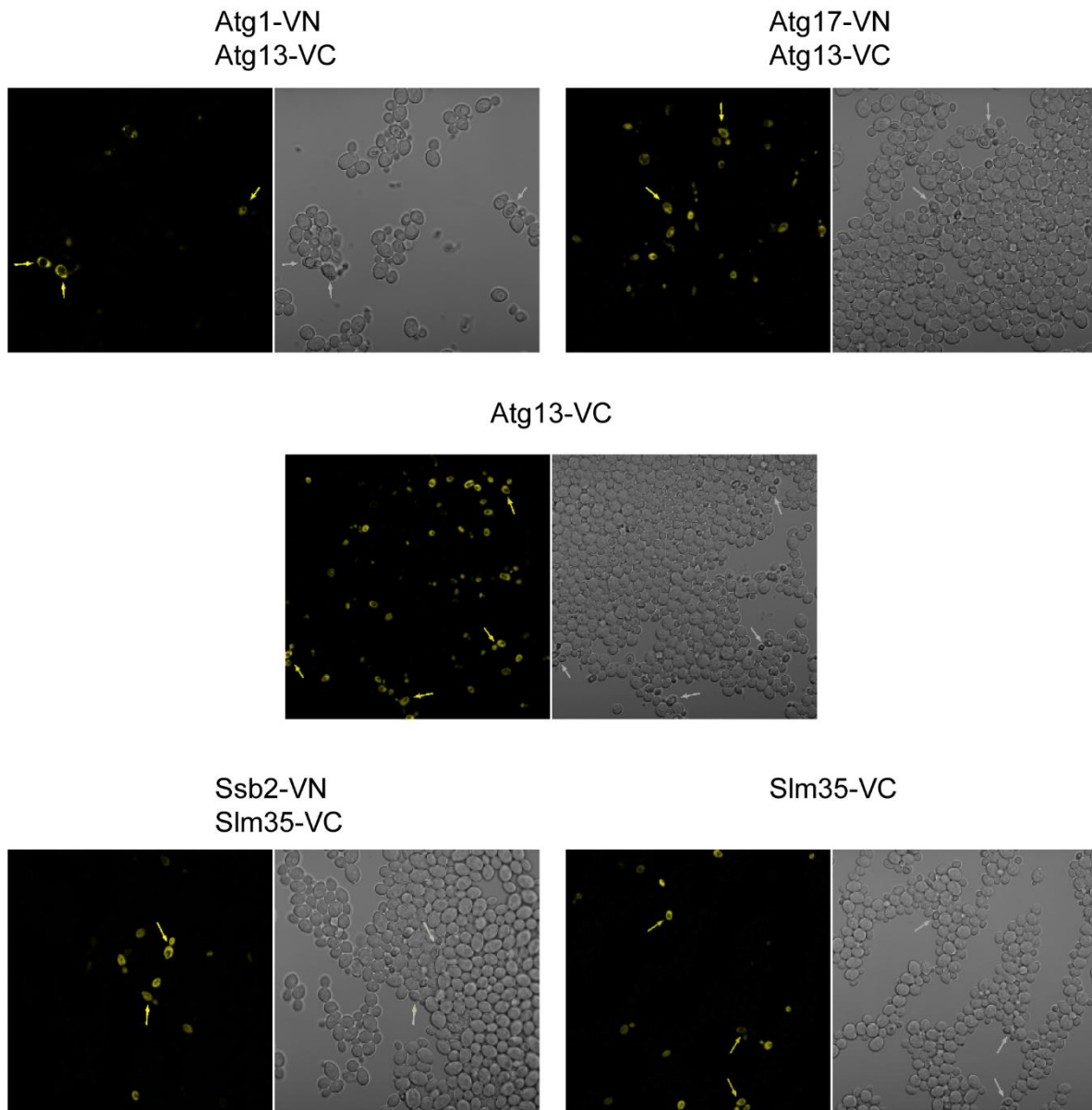


Figura 20. No es posible determinar interacciones físicas entre Atg1-Atg13, Atg17-Atg13 o Ssb2-Slm35 mediante el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular. Las interacciones físicas entre proteínas fueron evaluadas mediante el ensayo de complementación de fluorescencia bimolecular fusionando el amino terminal (VN) o el carboxilo terminal (VC) de la proteína fluorescente Venus en el carboxilo terminal de las proteínas indicadas. Las células se tomaron de un cultivo en fase estacionaria y fueron observadas al microscopio Zeiss LSM 800. Algunas de las células que presentaron fluorescencia intrínseca y morfología diferente son señaladas con flechas.

9 Discusión

El gen *SLM35* presenta una interacción genética negativa con el gen *TOR1* en condiciones de estrés oxidativo y térmico (Aguilar-Lopez et al., 2016). La proteína Tor1 es un punto central de regulación de varios procesos celulares como la autofagia que además de ser un proceso fisiológico, se activa en respuesta a diferentes tipos de estrés, como el oxidativo y el térmico (Farré & Subramani, 2016). El gen *SLM35* presenta también interacciones genéticas negativas con cinco distintos componentes del proceso de autofagia en condiciones de estrés térmico, sugiriendo que la proteína Slm35 también forma parte de las maquinarias de respuesta a estrés en *S. cerevisiae* (Aguilar-Lopez et al., 2016). De manera más específica, se demostró que el gen *SLM35* es un regulador negativo de la mitofagia, ya que en una mutante en donde este gen se encuentra ausente ($\Delta slm35$), el flujo mitofágico aumenta.

Con el objetivo de determinar con mayor precisión a que nivel actúa la proteína Slm35 con la maquinaria autofágica, en el presente trabajo evaluamos de manera sistemática posibles interacciones genéticas y funcionales entre el gen *SLM35* y algunos de los genes *ATG* involucrados en cada una de las diferentes etapas de autofagia general o específica. Las interacciones genéticas se dividen en negativas y positivas. Una interacción genética negativa es aquella condición en que dos genes participan en vías paralelas de una ruta metabólica y la ausencia de uno de estos genes es compensado por el otro gen. Una interacción genética positiva es aquella condición en que ambos genes participan en la misma vía y la ausencia de ambos genes es la suma de la ausencia de cada gen individual (Garay et al., 2014).

En primer lugar analizamos el fenotipo de crecimiento en condiciones estándar y de estrés oxidativo de las mutantes sencillas $\Delta slm35$ y $\Delta atgX$, y lo comparamos con el crecimiento de las dobles mutantes $\Delta atgX\Delta slm35$. La cepa $\Delta slm35$ presenta un fenotipo de resistencia ante condiciones de estrés oxidativo, y este fenotipo característico se perdió al eliminar simultáneamente a la mayoría de genes *ATG* evaluados, salvo *ATG36* que está involucrado en el proceso de

pexofagia. Estos resultados sugieren que el fenotipo de resistencia de la cepa *Δslm35* depende de los componentes de autofagia general como Atg1; de los componentes comunes a todos los tipos de autofagia específica como Atg11; y de receptores de mitofagia y de la vía Cvt como Atg32 y Atg19.

Se ha planteado que la mitofagia es un proceso de recambio de mitocondrias dañadas que permite mantener organelos sanos y funcionales (Kanki et al., 2015). Este mecanismo de control de calidad ha sido sugerido como una respuesta importante ante el estrés oxidativo (Kanki et al., 2015). De acuerdo con nuestros resultados y los publicados anteriormente, el fenotipo de resistencia a estrés oxidativo de la cepa *Δslm35* depende de un mayor recambio de mitocondrias (probablemente dañadas por el estrés oxidativo). Al eliminar de manera simultánea a los genes *ATG32* y *ATG33* que codifican para los receptores específicos de mitofagia, el fenotipo de resistencia se pierde ya que la mitofagia no puede ocurrir. Dicho de otra manera, estos resultados indican que el incremento en el flujo mitofágico observado en la cepa *Δslm35* es dependiente de los receptores específicos de mitofagia. El papel específico de *Slm35* como regulador de la mitofagia aún debe ser explorado, una posibilidad sería que la proteína *Slm35* esté involucrada en la regulación de la activación de *Atg32* al iniciar la mitofagia.

Por otro lado, observamos que el fenotipo también es dependiente de la vía Cvt. Esta vía es un tipo de autofagia selectiva la cual lleva proteasas y manosidasas en forma de zimógenos a la vacuola en donde son activadas y llevan a cabo su función (Farré & Subramani, 2016; Lynch-Day & Klionsky, 2010). En este punto, sugerimos que este efecto es indirecto sobre el fenotipo de resistencia al estrés oxidativo, ya que al eliminar esta vía estamos evitando procesos de degradación vacuolar involucrados en el metabolismo de componentes que participan en la resistencia al estrés oxidativo.

Para evaluar el efecto de *Slm35* sobre el proceso de autofagia general, evaluamos la degradación del reportero GFP-Atg8 (K. Suzuki et al., 2001), el cual al ser degradado vía autofagia, libera el dominio GFP en la vacuola que

permanece estable permitiendo su detección mediante inmunorréplicas tipo *Western Blot*. En las cepas donde eliminamos componentes que conforman el sitio de ensamblaje del fagóforo (PAS) (Atg1, Atg13 y Atg17), abatimos de manera total el proceso de autofagia en condiciones de estrés oxidativo, sin importar si Slm35 estaba presente o no. Este resultado era esperado debido a la función esencial de estas proteínas para todos los procesos autofágicos descritos hasta la fecha (Farré & Subramani, 2016).

A continuación, evaluamos del mismo modo si elementos de la autofagia que participan en la autofagia selectiva trabajan de manera conjunta con Slm35 durante el proceso de autofagia general. En primer lugar, evaluamos la participación de Atg11, la cual funciona primordialmente como una proteína de andamiaje de la carga a degradar (mitocondria, peroxisoma, etc.) con el PAS (Farré & Subramani, 2016). Nosotros encontramos que en la mutante sencilla *Δatg11* el proceso de autofagia en respuesta a estrés oxidativo se lleva a cabo de manera normal. Sin embargo, cuando eliminamos de manera conjunta a los genes *ATG11* y *SLM35* la autofagia general por estrés oxidativo medida por la degradación de GFP-Atg8 desaparece casi por completo. Este resultado es sorprendente ya que es la primera vez que se reporta que una proteína mitocondrial y una Atg involucrada en autofagia selectiva, son esenciales para la autofagia general en condiciones de estrés oxidativo.

A pesar de que el papel más estudiado de Atg11 es el de receptor común para todos los tipos de autofagia selectiva, también se le ha vinculado con la autofagia general. En primer lugar se reportó que Atg11 interactúa físicamente con Atg29, que es una de las proteínas involucradas en la formación del fagóforo. En este mismo estudio se observó que la eliminación simultánea de los genes *ATG11* y *ATG29* abate el proceso de autofagia a pesar de que esto no ocurre cuando los genes son eliminados de manera independiente (Mao et al., 2013). Este efecto aditivo es muy similar al observado en el presente trabajo entre los genes *ATG11* y *SLM35*.

También se reportó que Atg11 juega un papel importante durante la formación del fagóforo en la fase logarítmica de crecimiento pero no parece ser relevante en esta etapa de la autofagia durante la restricción calórica (Shintani & Klionsky, 2004). Por otro lado, se ha relacionado a Atg11 con fases tardías de la autofagia ya que interactúa físicamente con Vam7, una SNARE vacuolar, facilitando la fusión del autofagosoma con la vacuola. Es importante mencionar que este último proceso se lleva a cabo primordialmente por Atg17, por lo que en este punto parece haber una redundancia funcional entre Atg11 y Atg17 (X. Liu et al., 2016).

Será interesante saber cómo Slm35 y Atg11 participan de manera conjunta durante el proceso de autofagia en condiciones de estrés oxidativo. Como la eliminación simultánea de los genes *SLM35* y *ATG11* produce un efecto sintético negativo comparado con lo que se observa en las mutantes sencillas. Una posibilidad es que estos dos componentes participen en vías paralelas durante la activación de la autofagia. Ya que Slm35 es una proteína mitocondrial, se requeriría de la activación a otra proteína, hasta ahora desconocida pero con un papel equivalente al de Atg11 en el sitio de ensamblaje del fagóforo o en la fusión del autofagosoma con la vacuola (Figura 21). Otra posibilidad es que la proteína Slm35 este interactuando físicamente con proteínas de la vía autofágica. Para abordar este último punto es que utilizamos el ensayo de Complementación de Fluorescencia Bimolecular usando a la proteína fluorescente Venus como reportero (Sung & Huh, 2007). Sin embargo, al menos en nuestras condiciones experimentales, no fue posible analizar ningún tipo de interacción física. Una posibilidad para resolver el problema sería fusionar los fragmentos de Venus en los extremos amino terminal de cada proteína de interés, o realizar combinaciones de fusiones, es decir, fusionar a VN en el extremo amino terminal de una proteína, y el VC al extremo carboxilo terminal de la otra proteína o viceversa, ya que la disposición espacial de los fragmentos de Venus es importante para observar la interacción física (Sung & Huh, 2007). Esto se ha observado para evaluar las interacciones físicas de Atg11 con Atg29 y Atg11 con Vam7 (X. Liu et al., 2016; Mao et al., 2013). Otra alternativa para probar interacciones físicas sería probar

con el ensayo de complementación de fragmentos proteicos utilizando a la dihidrofolatoreductasa (DHFR) de ratón y evaluar las interacciones físicas analizando el crecimiento de las cepas en medios con metotrexato (Michnick, 2003). Elucidar el mecanismo que explique la interacción funcional entre SIm35 y Atg11, así como si ambas proteínas participan en procesos autofágicos activados por estímulos diferentes al estrés oxidativo, resulta indispensable para esclarecer la función de SIm35.

En nuestros experimentos de autofagia encontramos otro resultado sorprendente: la ausencia de autofagia general en la cepa $\Delta atg21$. Atg21 es una proteína que se une al autofagosoma mediante un dominio de unión a fosfoinosítidos, que son fosfolípidos que se encuentran en altas proporciones en las membranas de los autofagosomas, y permite la expansión del fagóforo en autofagia selectiva (Nair et al., 2010). Previamente se había analizado el papel de Atg21 en autofagia general sin encontrar ningún efecto en la cepa $\Delta atg21$ (Nair et al., 2010). Sin embargo, en dicho reporte también se identificó que la proteína Atg18 es homóloga a Atg21 y al eliminar simultáneamente a los genes que codifican para ambas proteínas sí se observó que la autofagia general desaparecía. Por lo tanto concluyeron que estas dos proteínas homólogas tienen funciones redundantes y en ausencia de una, la otra permite que la autofagia se desarrolle. No obstante, en ese trabajo también determinaron que el papel de Atg21 estaría especializado en autofagia selectiva y Atg18 en autofagia general. Una diferencia importante entre ese reporte inicial y nuestro trabajo es el inductor de autofagia usado: el trabajo de Nair y colaboradores se utilizó restricción calórica y nosotros estrés oxidativo, por lo que una explicación posible sería que estas proteínas juegan papeles diferentes de acuerdo con el estímulo que inicie el proceso de autofagia. Debido a su papel en la expansión del autofagosoma, nosotros proponemos que Atg21 es indispensable en este paso de la autofagia durante la respuesta a estrés oxidativo (Figura 21).

Por otro lado al eliminar otras proteínas que participan en la autofagia selectiva (Atg20 y Atg24), y al eliminar a los receptores específicos de autofagia

selectiva para la vía Cvt, mitocondrias y peroxisomas (Atg19; Atg32 y Atg33; y Atg36, respectivamente) no encontramos alteraciones en el proceso de autofagia general. Esto indica que Slm35 y estos componentes no están relacionadas con la autofagia general.

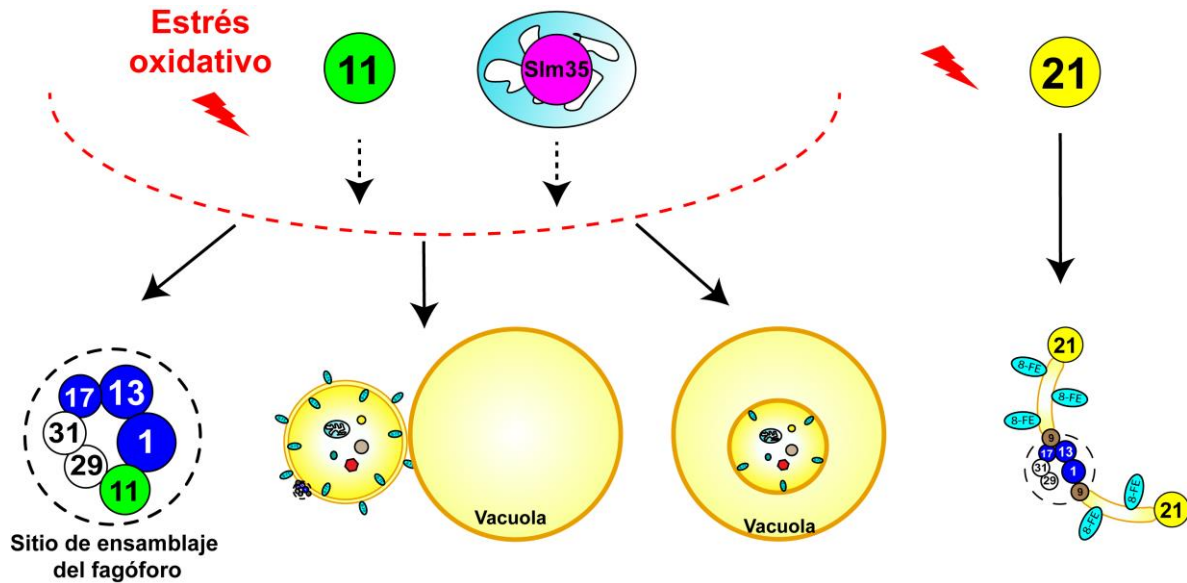


Figura 21. Modelo final. Con los resultados obtenidos en este trabajo, nosotros sugerimos que Atg11 y Slm35 participan en vías paralelas durante la autofagia en respuesta a estrés oxidativo. Este paso puede ser evitando la formación del PAS, la fusión del autofagosoma con la vacuola o un problema en la degradación del autofagosoma o en etapas posteriores. Atg21, por otra parte, nosotros sugerimos que es indispensable para la expansión del fagóforo en respuesta a estrés oxidativo.

10 Conclusiones

- No hay interacción genética entre los componentes de la autofagia y *SLM35* en condiciones normales.
- El fenotipo de resistencia a estrés oxidativo de la cepa $\Delta slm35$ es dependiente de los procesos de autofagia general, autofagia selectiva (mitofagia y vía Cvt) pero no de pexofagia.
- En ausencia de *SLM35* o *ATG11* de manera independiente no se afecta el proceso de autofagia general. Mientras que la ausencia simultánea de *SLM35* y *ATG11* si compromete el proceso de autofagia general en respuesta a estrés oxidativo.
- La proteína Atg21 es un componente necesario para la autofagia general en condiciones de estrés oxidativo.

11 Perspectivas

- Determinar si Slm35 y Atg11 son importantes para el proceso de autofagia general en una condición de restricción de nitrógeno. En esta condición se ha descrito de manera más detallada la cascada de activación de los componentes participantes de la autofagia general y posiblemente sea diferente a la activación de la autofagia mediante estrés oxidativo. Esta información nos indicaría si Slm35 y Atg11 son importantes para la autofagia general para diferentes estímulos de autofagia o si son específicos para estrés oxidativo.
- Conocer cuál es el paso limitante de la autofagia general en la cepa *Δatg11Δslm35*. Esto nos diría en que punto de la autofagia *ATG11* y *SLM35* convergen. Debido a que se ha descrito que Atg11 participa en etapas tempranas (formación del PAS en autofagia selectiva) y tardías (fusión del autofagosoma con la vacuola) de la autofagia, es interesante evaluar la presencia de autofagosomas en la doble mutante mediante fluorescencia utilizando el reportero GFP-Atg8. Este experimento determinará si los autofagosomas son o no formados o si es un paso distinto de la autofagia el limitante en la doble mutante.
- Hacer uso del ensayo de complementación de fragmentos proteicos utilizando a la DHFR de ratón como proteína reportera para evaluar interacciones físicas entre Slm35 y las proteínas Atg'X'. En este ensayo las interacciones físicas son evaluadas mediante el crecimiento de las cepas en un medio que tiene metotrexato. Si hay interacción física entre las proteínas, la cepa es capaz de crecer en este medio.

12 Anexos

12.1 Verificación de mutantes *Δatgx*

Se recuperaron las mutantes sencillas *Δatgx* de la colección de mutantes y se realizaron las mutantes *Δatgx* que no fueron recuperadas de esta colección. Se verificaron por PCR como se indica en la sección de Materiales y Métodos. Los resultados obtenidos muestran que todas las cepas son mutantes para el gen que correspondiente (Figura A1).

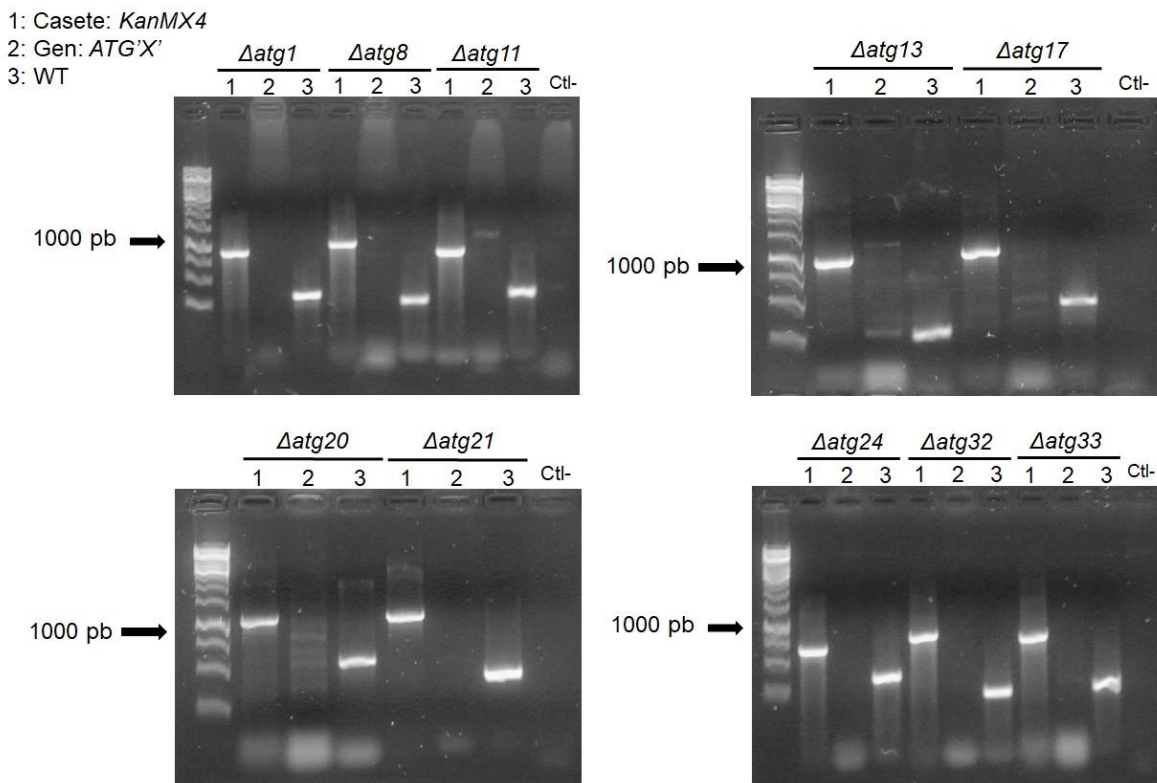


Figura A1. Verificación de mutantes por PCR. Productos amplificados en las mutantes indicadas para la presencia del casete de resistencia (1) o del gen en las cepas mutantes (2) o en la cepa WT (3). Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El Ctl- se realizó añadiendo agua a la reacción en lugar de DNA.

12.2 Verificación de mutantes *ΔatgxΔslm35*

Después de corroborar las mutantes sencillas de las cepas *Δatgx* se prosiguió a realizar las dobles mutantes *ΔatgxΔslm35* por el método de recombinación

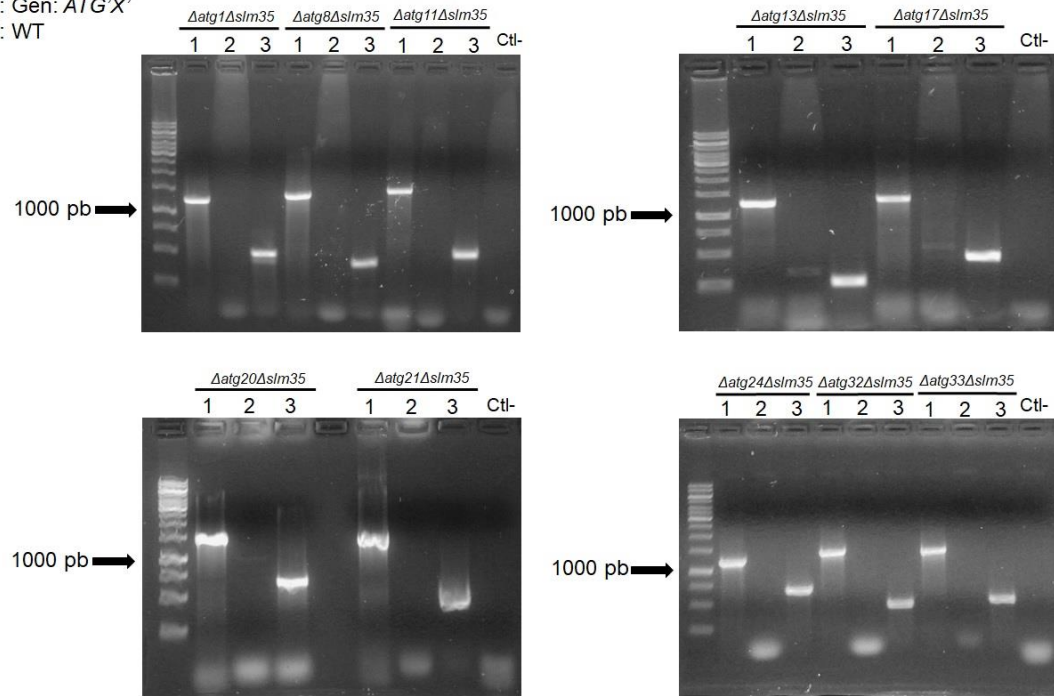
homóloga. Una vez obtenidas las mutantes se corroboró por PCR que las cepas fueran mutantes para el gen *ATG* correspondiente (Figura A2A). Una vez confirmando que son mutantes par el gen *ATG*, se verificó que fueran mutantes para el gen *SLM35*, mediante PCR confirmamos la ausencia del ORF de *Slm35* (tamaño de la banda esperada: 1080 pb) y la presencia del casete de resistencia *HphMX* (tamaño de la banda esperada: 1010 pb) (Figura A2B). Por lo tanto confirmamos la obtención de las dobles mutantes $\Delta atgx\Delta slm35$.

A

1: Casete: *KanMX4*

2: Gen: *ATG'X'*

3: WT



B

- 1: $\Delta atg1\Delta slm35$
- 2: $\Delta atg8\Delta slm35$
- 3: $\Delta atg11\Delta slm35$
- 4: $\Delta atg13\Delta slm35$
- 5: $\Delta atg17\Delta slm35$
- 6: $\Delta atg20\Delta slm35$
- 7: $\Delta atg21\Delta slm35$
- 8: $\Delta atg24\Delta slm35$
- 9: $\Delta atg32\Delta slm35$
- 10: $\Delta atg33\Delta slm35$
- 11: WT
- 12: Ctl-

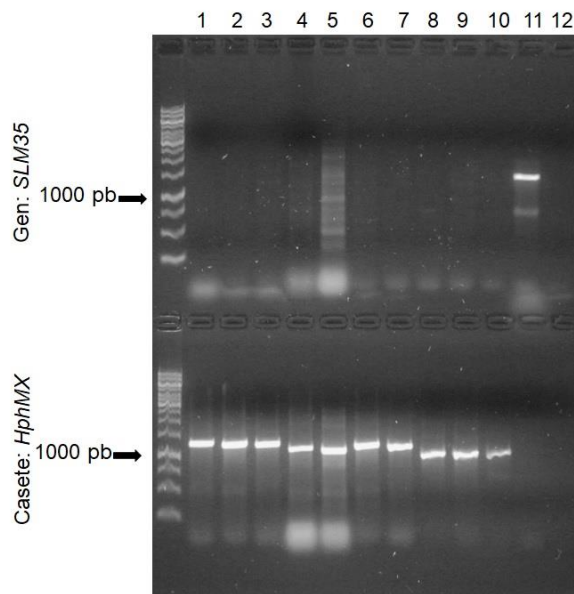


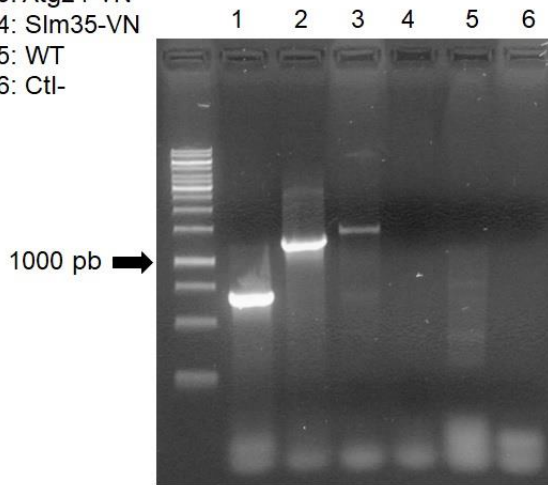
Figura A2. Verificación de las mutantes $\Delta atgX\Delta slm35$ por PCR. Productos amplificados en las mutantes indicadas para la presencia del gen o del casete de resistencia *KanMX4* (A) o *HphMX* (B) según se indica. Las muestras se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El Ctl- se realizó añadiendo agua a la reacción en lugar de DNA.

12.3 Verificación de cepas con la construcción AtgX-VN

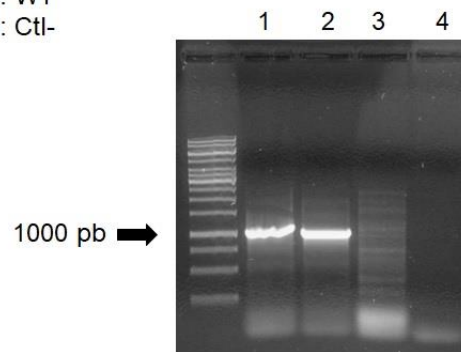
Las Atg fusionadas al dominio amino terminal de Venus (AtgX-VN) fueron recuperadas de la colección de cepas de Bionner con excepción de la cepa con la construcción de Atg33-VN, la cual no se encuentra dentro de la colección (Sung & Huh, 2007). Estas cepas fueron corroboradas mediante PCR como se describe en Materiales y Métodos. Además de las cepas anteriormente mencionadas también se recuperaron las cepas SIm35-VN para evaluar alguna posible interacción homocinética y Tor1-VN para evaluar una posible interacción física entre esta y SIm35, debido a la interacción genética que estos genes presentan en condiciones de estrés (Aguilar-Lopez et al., 2016).

Como se muestra en la figura A3 se corroboraron las fusiones en las cepas obtenidas, con excepción de la cepa Tor1-VN ya que el producto de PCR predicho es de aproximadamente 7,400 pares de bases y no observamos amplificación de este producto.

1: Atg8-VN
2: Atg17-VN
3: Atg24-VN
4: SIm35-VN
5: WT
6: Ctl-



1: SIm35-VN
2: SIm35-VN 1:10
3: WT
4: Ctl-



1: Atg1-VN
2: Atg11-VN
3: Atg13-VN
4: Atg20-VN
5: Atg21-VN
6: Atg32-VN
7: WT
8: Ctl-

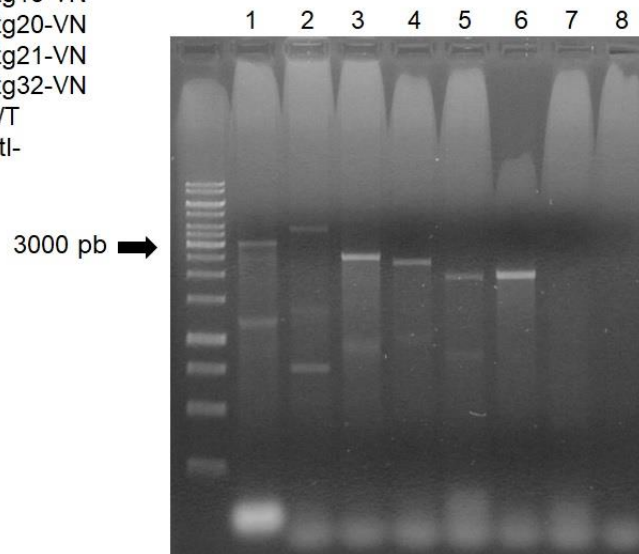


Figura A3. Verificación de las fusiones AtgX-VN y SIm35-VN por PCR. Productos amplificados para verificar la presencia de la fusión indicada. El Ctl- fue realizado añadiendo agua a la reacción en lugar de DNA.

12.4 Verificación de las cepas con la fusión SIm35-VC y Atg13-VC

Obtenidas las cepas con el amino terminal de Venus, se prosiguió con la fusión del dominio carboxilo terminal de Venus a SIm35 (SIm35-VC) y a Atg13 (Atg13-VC) como se describe en Materiales y Métodos. Posterior a la transformación, las colonias obtenidas fueron evaluadas por PCR para corroborar la fusión SIm35-VC usando dos oligos sentido, los cuales se aparean en distintos lugares del gen *SLM35*, para obtener bandas esperadas de 2000 y 3000 pb; también se corroboró la construcción Atg13-VC esperando una banda de 2000 pb. Como se muestra en la figura A4, se obtuvo una colonia de SIm35-VC con la construcción esperada y esta fue usada para los posteriores experimentos. En el caso de Atg13-VC se obtuvieron 5 colonias, nosotros decidimos trabajar con la colonia 4 para los siguientes experimentos.

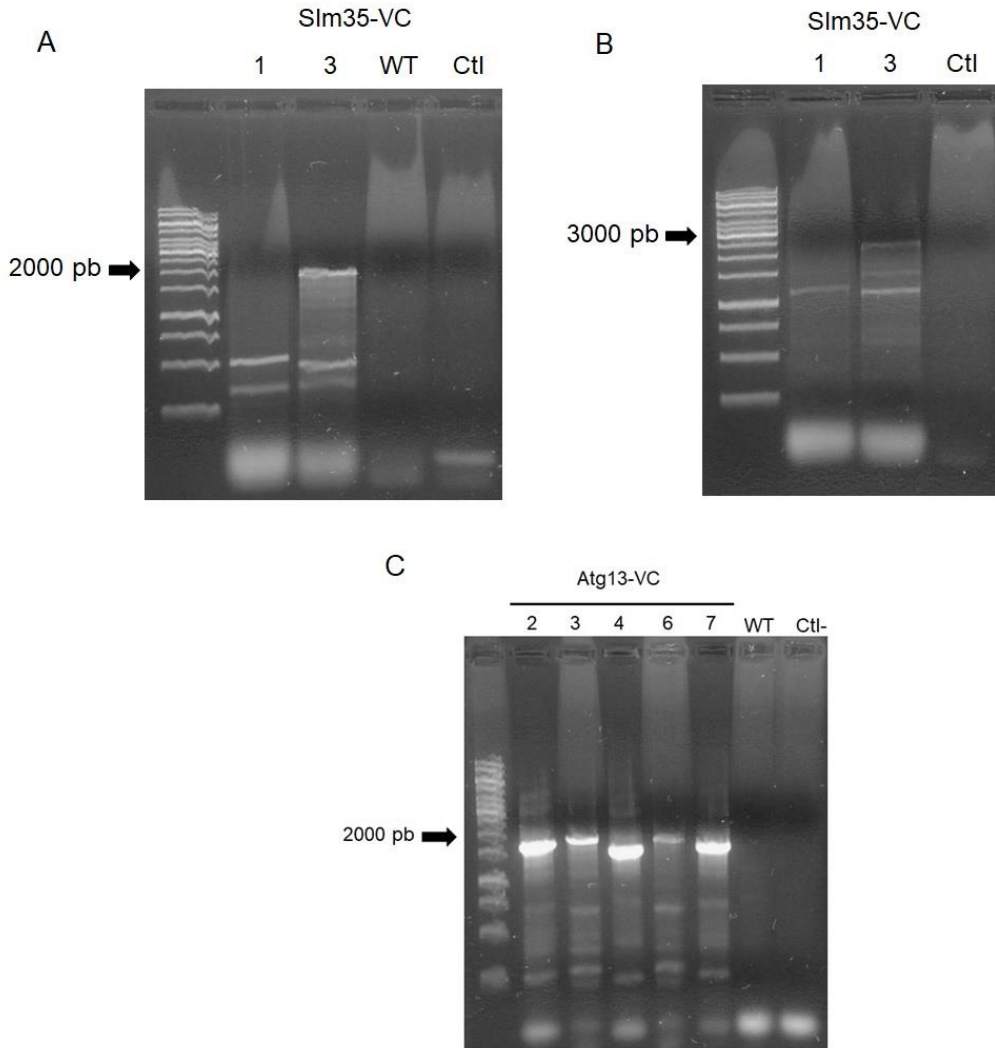


Figura A4. Verificación de la construcción SIm35-VC y Atg13-VC por PCR. Productos amplificados de 2000 pb (A y C) o de 3000 pb (B) para verificar la presencia de la construcción indicada.

Una vez verificadas las construcciones con los dominios de Venus las cepas fueron cruzadas y posteriormente seleccionadas como se describió en Material y Métodos para obtener las células diploides.

12.5 Medios de cultivo

YPD

Componente	Concentración
Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%
Agar*	2%

*Para medio sólido.

YPG

Componente	Concentración
Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glicerol	2%
Agar*	2%

*Para medio sólido.

LB

Componente	Concentración
Extracto de levadura	0.5%
Triptona	1%
NaCl	1%
Agar*	2%

*Para medio sólido.

SD Mínimo-Ura

Componente	Concentración
Base de Nitrógeno de Levadura	0.17%
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5%
Glucosa	2%
Leucina	100 mg/L

Adenina	20 mg/L
Histidina	20 mg/L
Triptófano	20 mg/L
Metionina	20 mg/L
Lisina	30 mg/L
Agar*	2%

*Para medio sólido.

YPD+Geneticina

Componente	Concentración
Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%
Geneticina	200 mg/L
Agar*	2%

*Para medio sólido.

YPD+Geneticina+Higromicina

Componente	Concentración
Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Glucosa	2%
Geneticina	200 mg/L
Higromicina	250 mg/L
Agar*	2%

*Para medio sólido.

LB+Ampicilina

Componente	Concentración
Extracto de levadura	0.5%
Triptona	1%

NaCl	1%
Ampicilina	100 mg/L
Agar*	2%

*Para medio sólido.

SD –Met –Lis –Ura +Geneticina

Componente	Concentración
Base de Nitrógeno de Levadura	0.17%
Glutamato monosódico	0.5%
Glucosa	2%
Drop out –Met –Lis –Ura 10X**	10%
Geneticina	200 mg/L
Agar*	2%

*Para medio sólido.

**Drop out –Met –Lis –Ura 10X para 1 L

Componente	Concentración
Arginina	200 mg/L
Leucina	600 mg/L
Asparagina	1 g/L
Glutamato monosódico	1 g/L
Fenilalanina	500 mg/L
Serina	3.75 g/L
Adenina	200 mg/L
Histidina	200 mg/L
Triptófano	400 mg/L
Treonina	2 g/L
Tirosina	300 mg/L
Valina	1.5 g/L

SD Completo -Ura

Componente	Concentración
Base de Nitrógeno de Levadura	0.17%
Glutamato monosódico	0.1%
Glucosa	2%
Drop out –Ura ^{***}	0.2%
Agar*	2%

^{***}Drop out –Ura

Componente	Concentración
Adenina	3 g
Inositol	2 g
Ácido p-aminobenzoico	200 mg
Alanina	2 g
Arginina	2 g
Asparagina	2 g
Aspartato	2 g
Cisteína	2 g
Glutamato	2 g
Glutamina	2 g
Glicina	2 g
Histidina	2 g
Isoleucina	2 g
Leucina	10 g
Lisina	2 g
Metionina	2 g
Fenilalanina	2 g
Prolina	2 g
Serina	2 g
Treonina	2 g

Triptófano	2 g
Tirosina	2 g
Valina	2 g

12.6 Soluciones

TAE 50X

Componente	Concentración
Tris	242 g/L
Ácido acético glacial	51.7 ml/L
EDTA 0.5M pH=8	100 ml/L

Buffer de Corrida

Componente	Concentración
Tris HCL	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%

Buffer de Corrida

Componente	Concentración
Tris HCL	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0.1%
Metanol	20 %

LAE 2X

Componente	Concentración
------------	---------------

Tris HCL pH=6.8	240 mM
Azul de Bromofenol	0.04 %
β-Mercaptoetanol	10 %
SDS	4 %
Metanol	20 %

12.7 Viabilidad celular en presencia de H₂O₂ y tBOOH

Se evaluaron las curvas de crecimiento de la cepa WT en presencia o ausencia de los inductores de estrés oxidativo. Se observó que tanto el H₂O₂ y el tBOOH arrestan el crecimiento celular en medio líquido después de 3 horas de exposición. 24 horas después de estimular las células con H₂O₂ o con tBOOH, se plaquearon 200 µL de cultivo celular en medio fresco sólido y se evaluó el crecimiento celular. Con este experimento se observó que después de 24 horas de estrés oxidativo con H₂O₂ las células no son viables. En cambio, las células si son viables después de 24 horas en presencia de tBOOH (Figura A5) (Tesis de Maestría Romo Casanueva 2018).

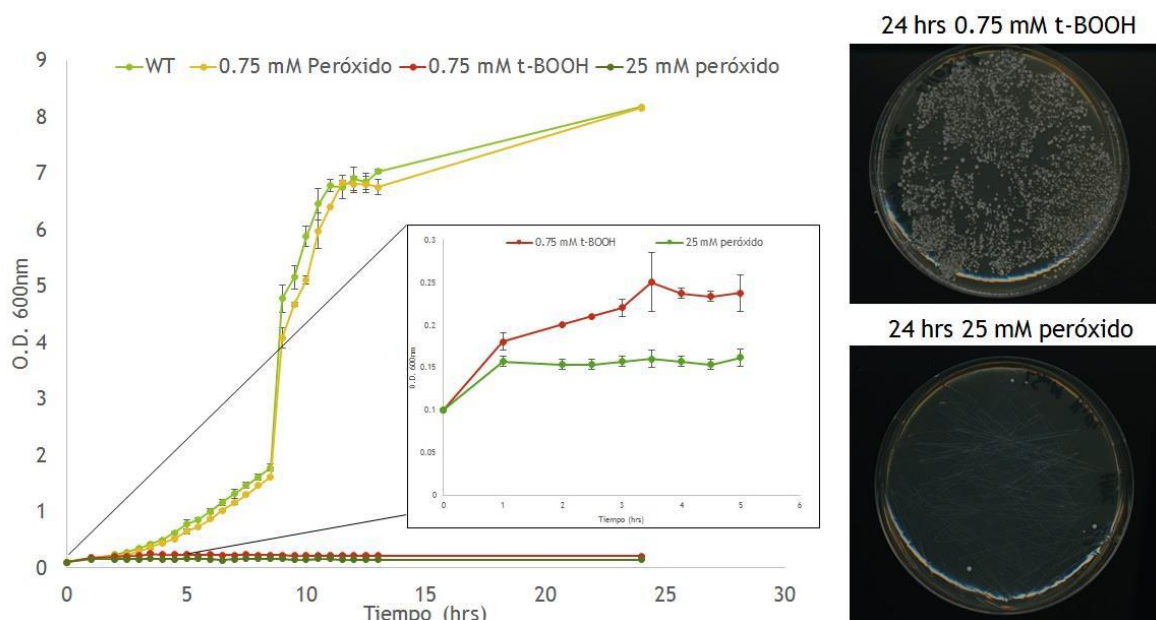


Figura A5. Una exposición de 24 horas de H₂O₂ mata a las células pero no así el tBOOH. Cultivos líquidos celulares de la cepa WT fueron estimulados con H₂O₂ o con tBOOH y se obtuvo la curva de crecimiento. 24 horas después del estímulo, 200 µL de cada cultivo fueron plaqueados en medio sólido fresco para evaluar la viabilidad celular.

13 Bibliografía

- Abeliovich, H., & Dengjel, J. (2016). Mitophagy as a stress response in mammalian cells and in respiring *S. cerevisiae*. *Biochemical Society Transactions*, 44(2), 541–545. <https://doi.org/10.1042/bst20150278>
- Aguilar-Lopez, J. L., Laboy, R., Jaimes-Miranda, F., Garay, E., DeLuna, A., & Funes, S. (2016). Slm35 links mitochondrial stress response and longevity through TOR signaling pathway. *Aging*, 8(12), 3255–3271. <https://doi.org/10.18632/aging.101093>
- Alers, S., Wesselborg, S., & Stork, B. (2014). Atg13. *Autophagy*, 10(6), 944–956. <https://doi.org/10.4161/auto.28987>
- Backues, S. K., & Klionsky, D. J. (2012). Atg11. *Autophagy*, 8(8), 1275–1278. <https://doi.org/10.4161/auto.21153>
- Barth, H., Meiling-Wesse, K., Epple, U. D., & Thumm, M. (2002). Mai1p is essential for maturation of proaminopeptidase I but not for autophagy. *FEBS Letters*, 512(1–3), 173–179. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02252-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02252-4)
- Bolt, M. W., & Mahoney, P. A. (1997). High-efficiency blotting of proteins of diverse sizes following SDS-PAGE. *Anal. Biochem.*, 247(247), 185–192.
- Burke, D., Dawson, D., Stearns, T., & Cold Spring Harbor Laboratory. (2000). *Methods in yeast genetics: a Cold Spring Harbor Laboratory course manual* (2000 ed.). Retrieved from <https://searchworks.stanford.edu/view/5058301>
- Carroll, B., Otten, E. G., Manni, D., Stefanatos, R., Menzies, F. M., Smith, G. R., ... Korolchuk, V. I. (2018). Oxidation of SQSTM1/p62 mediates the link between redox state and protein homeostasis. *Nature Communications*, 9(1), 256. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02746-z>
- Daniel Gietz, R., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350, 87–96. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)
- Delorme-Axford, E., Guimaraes, R. S., Reggiori, F., & Klionsky, D. J. (2015). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: An overview of methods to study autophagy progression. *Methods*, 75, 3–12. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.12.008>
- Delorme-Axford, E., & Klionsky, D. J. (2015). A missing piece of the puzzle: Atg11 functions as a scaffold to activate Atg1 for selective autophagy. *Autophagy*, 11(12), 2139–2141. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1116672>
- Du, L.-L., Dong, M.-Q., Xiong, X., Yu, Z.-Q., Zhao, D., Liu, X.-M., & Sun, L.-L. (2016). Atg20- and Atg24-family proteins promote organelle autophagy in fission yeast. *Journal of Cell Science*, 129(22), 4289–4304. <https://doi.org/10.1242/jcs.194373>
- Eiyama, A., Kondo-Okamoto, N., & Okamoto, K. (2013). Mitochondrial degradation during starvation is selective and temporally distinct from bulk autophagy in

- yeast. *FEBS Letters*, 587(12), 1787–1792.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.04.030>
- Farré, J. C., Burkenroad, A., Burnett, S. F., & Subramani, S. (2013). Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Reports*, 14(5), 441–449.
<https://doi.org/10.1038/embor.2013.40>
- Farré, J. C., & Subramani, S. (2016). Mechanistic insights into selective autophagy pathways: Lessons from yeast. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(9), 537–552. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.74>
- Filomeni, G., De Zio, D., & Cecconi, F. (2015). Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. *Cell Death and Differentiation*, 22(3), 377–388. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.150>
- Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Yamamoto, H., Kondo-Kakuta, C., Kimura, Y., Hirano, H., ... Noda, N. N. (2014). Structural basis of starvation-induced assembly of the autophagy initiation complex. *Nature Structural and Molecular Biology*, 21(6), 513–521. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2822>
- Garay, E., Campos, S. E., González de la Cruz, J., Gaspar, A. P., Jinich, A., & DeLuna, A. (2014). High-Resolution Profiling of Stationary-Phase Survival Reveals Yeast Longevity Factors and Their Genetic Interactions. *PLoS Genetics*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004168>
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), 1541–1553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:14<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)
- Hess, D. C., Myers, C. L., Huttenhower, C., Hibbs, M. A., & Hayes, A. P. (2009). Computationally Driven, Quantitative Experiments Discover Genes Required for Mitochondrial Biogenesis. *PLoS Genet*, 5(3), 1000407.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000407>
- Huh, W., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., & Shea, E. K. O. (2003). *Huh_2003_Nature*. Retrieved from <papers3://publication/uuid/59852D76-30D2-460A-8BC7-EAF968B42414>
- Ishihara, N., & Mizushima, N. (2009). A Receptor for Eating Mitochondria. *Developmental Cell*, 17(1), 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.07.003>
- Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., & Krick, R. (2015). *PI 3 P binding by Atg 21 organises Atg 8 lipidation*. 34(7), 955–973.
- Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., & Ohsumi, Y. (2005). Atg17 Functions in Cooperation with Atg1 and Atg13 in Yeast Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 16(5), 2544–2553.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-08-0669>
- Kanki, T., Furukawa, K., & Yamashita, S. ichi. (2015). Mitophagy in yeast:

- Molecular mechanisms and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2756–2765.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.005>
- Kanki, T., & Klionsky, D. J. (2008). Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 283(47), 32386–32393.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M802403200>
- Kanki, T., & Klionsky, D. J. (2009). Atg32 is a tag for mitochondria degradation in yeast. *Autophagy*, 5(8), 1201–1202. <https://doi.org/10.4161/auto.5.8.9747>
- Kiel, J. A. K. W. (2010). Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1541), 819–830. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0237>
- Krick, R., & Thumm, M. (2016). Atg8 lipidation is coordinated in a PtdIns3P-dependent manner by the PROPPIN Atg21. *Autophagy*, 12(11), 2260–2261. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1221564>
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, J., Giordano, S., & Zhang, J. (2012). Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *The Biochemical Journal*, 441(2), 523–540. <https://doi.org/10.1042/BJ20111451>
- Leidhold, C., Sickmann, A., Pfanner, N., Meisinger, C., Voos, W., Vögtle, F.-N., ... Wortelkamp, S. (2009). Global Analysis of the Mitochondrial N-Proteome Identifies a Processing Peptidase Critical for Protein Stability. *Cell*, 139(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.045>
- Lemasters, J. J. (2005). *John j. lemasters*. 8(1), 3–5.
- Li, W. W., Li, J., & Bao, J. K. (2012). Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 69, pp. 1125–1136.
<https://doi.org/10.1007/s00018-011-0865-5>
- Liu, L., Sakakibara, K., Chen, Q., & Okamoto, K. (2014). Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Research*, 24(7), 787–795.
<https://doi.org/10.1038/cr.2014.75>
- Liu, X., Mao, K., Yu, A. Y. H., Omairi-Nasser, A., Austin, J., Glick, B. S., ... Klionsky, D. J. (2016). The Atg17-Atg31-Atg29 Complex Coordinates with Atg11 to Recruit the Vam7 SNARE and Mediate Autophagosome-Vacuole Fusion. *Current Biology*, 26(2), 150–160.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.11.054>
- Lynch-Day, M. A., & Klionsky, D. J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1359–1366.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.013>

- Mao, K., Wang, K., Liu, X., & Klionsky, D. J. (2013). The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Developmental Cell*, 26(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.05.024>
- Michnick, S. W. (2003). Protein fragment complementation strategies for biochemical network mapping. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(6), 610–617. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2003.10.014>
- Mizushima, N. (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.12.004>
- Morano, K. A., Grant, C. M., & Moye-Rowley, W. S. (2012). The response to heat shock and oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157–1195. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>
- Motley, A. M., Nuttall, J. M., & Hettema, E. H. (2012). Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO Journal*, 31(13), 2852–2868. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.151>
- Mulford, K. E., & Fassler, J. S. (2011). Association of the Skn7 and Yap1 Transcription Factors in the *Saccharomyces cerevisiae* Oxidative Stress Response. *EUKARYOTIC CELL*, 10(6), 761–769. <https://doi.org/10.1128/EC.00328-10>
- Müller, M., Lu, K., & Reichert, A. S. (2015). Mitophagy and mitochondrial dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), 2766–2774. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.024>
- Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., ... Otsu, K. (2015). Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nature Communications*, 6(May), 1–14. <https://doi.org/10.1038/ncomms8527>
- Nair, U., Cao, Y., Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2010). Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 and Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway and autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), 11476–11488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.080374>
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a Ubiquitin-like Protein Required for Autophagosome Formation, Mediates Membrane Tethering and Hemifusion. *Cell*, 130(1), 165–178. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.021>
- Nice, D. C., Sato, T. K., Stromhaug, P. E., Emr, S. D., & Klionsky, D. J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(33), 30198–30207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204736200>

- Nice, D. C., Veenhuis, M., Ohsumi, Y., Klionsky, D. J., Funakoshi, T., Nau, J. J., ... Scott, S. V. (2002). Apg13p and Vac8p Are Part of a Complex of Phosphoproteins That Are Required for Cytoplasm to Vacuole Targeting. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25840–25849. <https://doi.org/10.1074/jbc.m002813200>
- Noda, N. N., & Fujioka, Y. (2015). Atg1 family kinases in autophagy initiation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(16), 3083–3096. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1917-z>
- Noda, N. N., & Inagaki, F. (2015). Mechanisms of Autophagy. *Annual Review of Biophysics*, 44(1), 101–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-060414-034248>
- Noda, N. N., Ohsumi, Y., & Inagaki, F. (2010). Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Letters*, 584(7), 1379–1385. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.018>
- Okamoto, K., Kondo-Kakuta, C., Kuge, O., Hashimoto, A., Nagumo, S., Okumura, N., ... Ohsumi, Y. (2015). Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *The EMBO Journal*, 34(21), 2703–2719. <https://doi.org/10.15252/emj.201591440>
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., & Ohsumi, Y. (2009). Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell*, 17(1), 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>
- Parzych, K. R., Ariosa, A., Mari, M., & Klionsky, D. J. (2018). A newly characterized vacuolar serine carboxypeptidase, Atg42/Ybr139w, is required for normal vacuole function and the terminal steps of autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 29(9), 1089–1099. <https://doi.org/10.1091/mbc.e17-08-0516>
- Popelka, H., & Klionsky, D. J. (2017). The molecular mechanism of Atg13 function in autophagy induction: What is hidden behind the data? *Autophagy*, 13(3), 449–451. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1277312>
- Ragusa, M. J., Stanley, R. E., & Hurley, J. H. (2012). Architecture of the atg17 complex as a scaffold for autophagosome biogenesis. *Cell*, 151(7), 1501–1512. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.11.028>
- Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., & Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: Multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5(7), 1543–1554. <https://doi.org/10.1021/pr050477f>
- Saigusa, T., Kurihara, Y., Kanki, T., Kang, D., Aoki, Y., Uchiumi, T., & Hirota, Y. (2011). Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 22(17), 3206–3217. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-02-0145>

- Schlotterhose, P., Reinhold, R., Dudek, J., Thumm, M., Rehling, P., Welter, E., ... Krick, R. (2013). Uth1 is a mitochondrial inner membrane protein dispensable for post-log-phase and rapamycin-induced mitophagy. *FEBS Journal*, *280*(20), 4970–4982. <https://doi.org/10.1111/febs.12468>
- Scott, S. V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J., & Klionsky, D. J. (2001). Cvt19 Is a Receptor for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting Pathway. *Molecular Cell*, *7*(6), 1131–1141. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00263-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00263-5)
- Shintani, T., & Klionsky, D. J. (2004). Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, *279*(29), 29889–29894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404399200>
- Sivagnanam, U., Palanirajan, S. K., & Gummadi, S. N. (2017). The role of human phospholipid scramblases in apoptosis: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1864*(12), 2261–2271. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.08.008>
- Slobodkin, M. R., & Elazar, Z. (2013). The Atg8 family: multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays In Biochemistry*, *55*, 51–64. <https://doi.org/10.1042/bse0550051>
- Song, S., Tan, J., Miao, Y., & Zhang, Q. (2018). Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: Involvement of UPR and the core autophagy machinery. *Journal of Cellular Physiology*, *233*(5), 3867–3874. <https://doi.org/10.1002/jcp.26137>
- Strømhaug, P. E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.-W., & Klionsky, D. J. (2004). Atg21 Is a Phosphoinositide Binding Protein Required for Efficient Lipidation and Localization of Atg8 during Uptake of Aminopeptidase I by Selective Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(8), 3553–3566. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0147>
- Sung, M.-K., & Huh, W.-K. (2007). Bimolecular fluorescence complementation analysis system for in vivo detection of protein–protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *24*(9), 767–775. <https://doi.org/10.1002/yea.1504>
- Suzuki, K. (2013). Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death and Differentiation*, *20*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.73>
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., & Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal*, *20*(21), 5971–5981. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5971>
- Taylor, R., Jin, S. V., Qi, H., Xu, W., Zhang, Y., & Liu, L. F. (2014). The Role of Autophagy in Mitochondria Maintenance: Characterization of Mitochondrial Functions in Autophagy-Deficient *S. cerevisiae* Strains. *Autophagy*, *3*(4), 337–346. <https://doi.org/10.4161/auto.4127>

- Wang, K., Jin, M., Liu, X., & Klionsky, D. J. (2013). Proteolytic processing of Atg32 by the mitochondrial i-AAA protease Yme1 regulates mitophagy. *Autophagy*, 9(11), 1828–1836. <https://doi.org/10.4161/auto.26281>
- Wang, X., Li, S., Liu, Y., & Ma, C. (2015). Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biology*, 4, 104–108. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2014.12.006>
- Willmund, F., del Alamo, M., Pechmann, S., Chen, T., Albanèse, V., Dammer, E. B., ... Frydman, J. (2013). The Cotranslational Function of Ribosome-Associated Hsp70 in Eukaryotic Protein Homeostasis. *Cell*, 152(1–2), 196–209. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.12.001>
- Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., ... Davis, R. W. (1999). Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science (New York, N.Y.)*, 285(5429), 901–906. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.285.5429.901>
- Xiong, Y., Contento, A. L., Nguyen, P. Q., & Bassham, D. C. (2006). Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 143(1), 291–299. <https://doi.org/10.1104/pp.106.092106>
- Yamamoto, H., Fujioka, Y., Suzuki, S. W., Noshiro, D., Suzuki, H., Kondo-Kakuta, C., ... Ohsumi, Y. (2016). The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Developmental Cell*, 38(1), 86–99. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.06.015>
- Yen, W.-L., Mao, K., Lynch-Day, M. A., Du, Z., Geng, J., Baba, M., ... Kanki, T. (2009). A Genomic Screen for Yeast Mutants Defective in Selective Mitochondria Autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, 20(22), 4730–4738. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-03-0225>