



Facultad de Biología
Departamento de Biología Celular

CONTROL DE CALIDAD DE LA EXPORTACIÓN SELECTIVA DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO MEDIADA POR LÍPIDOS

TESIS DOCTORAL REALIZADA EN EL PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOLOGÍA
INTEGRADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR

DÑA. SUSANA SABIDO BOZO

SEVILLA, 2022

La doctoranda

Susana Sabido Bozo

El director y tutor

Manuel Muñiz Guinea

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	7
RESUMEN.....	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. La ruta secretora.....	15
1.1.1. Formación y ensamblaje de vesículas de transporte COPII	16
1.1.2. Formación de los sitios de salida del retículo endoplásmico o ERES	18
1.2. Sorting de proteínas en la ruta secretora	19
1.2.1. <i>Sorting</i> de proteínas mediado por secuencias señal.....	20
1.2.2. <i>Sorting</i> de proteínas mediado por la composición lipídica diferencial de la membrana .	21
1.2.2.1. Composición lipídica de las membranas a lo largo de la ruta secretora.....	21
1.2.2.2. Segregación lateral de lípidos como mecanismo de <i>sorting</i>	23
1.3. Exportación de las proteínas ancladas a GPI del RE	27
1.3.1. Requisitos específicos de la maquinaria de cubierta COPII para el transporte de las proteínas ancladas a GPI.....	30
1.3.1.1. El receptor p24.....	31
1.3.1.2. Remodelación del glicano del GPI.....	33
1.3.2. <i>Sorting</i> de las proteínas ancladas a GPI previa exportación del RE.....	34
1.3.2.1. Remodelación lipídica del GPI.....	35
1.3.2.2. Síntesis y transporte de ceramida.....	36
1.3.2.3. Modelo de <i>sorting</i> de las proteínas ancladas a GPI dependiente de ceramida.....	38
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	41
3. RESULTADOS	53
3.1. Análisis del papel de la ceramida presente en la estructura del GPI en la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI a través de ERES específicos.....	55
3.1.1. La ceramida C26 incorporada al GPI por Cwh43 es necesaria para el <i>clustering</i> de Gas1 y su posterior exportación del RE.....	55
3.1.2. Ted1 monitoriza la incorporación de ceramida C26 en el GPI de Gas1 para garantizar su exportación del RE	58
3.1.3. La segregación selectiva de Gas1 en ERES específicos depende de la remodelación de ceramida del GPI.....	68
3.2. Implicación del receptor p24 en el mecanismo de segregación selectiva de proteínas ancladas a GPI mediado por ceramidas	72
3.2.1. Los <i>clusters</i> de la proteína anclada a GPI Gas1 se localizan en zonas del RE con mayor grosor de membrana	72
3.2.1. Papel del dominio transmembrana de Emp24 en la formación de <i>clusters</i> de Gas1-GFP dependiente de ceramidas muy largas C26.....	74
4. DISCUSIÓN	81
4.1. Control de calidad ejercido sobre la segregación selectiva mediada por lípidos de las proteínas ancladas a GPI	83

4.2.	¿Cuál es el mecanismo responsable de esta segregación selectiva mediada por lípidos?.....	88
4.3.	Segregación selectiva de proteínas ancladas a GPI en mamíferos	93
5.	CONCLUSIONES	95
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	99
6.1.	Organismos y condiciones de cultivo	101
6.1.1.	Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	101
6.1.2.	Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
6.2.	Técnicas genéticas	104
6.2.1.	Técnicas de manipulación de ADN	104
6.2.1.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	104
6.2.1.2.	Restricción enzimática y ligación de plásmidos o fragmentos de ADN	104
6.2.1.3.	Separación y visualización de los fragmentos de AND en geles de agarosa	105
6.2.2.	Purificación de ADN desde <i>Escherichia coli</i>	105
6.2.3.	Transformación de <i>Escherichia coli</i>	106
6.2.4.	Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	106
6.2.4.1.	Método <i>One Step</i>	106
6.2.4.2.	Método Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol	106
6.2.5.	Cruce, esporulación y disección de tétradas	107
6.2.6.	Construcción de plásmidos	108
6.3.	Técnicas bioquímicas	109
6.3.1.	Extractos celulares de levadura	109
6.3.2.	Electroforesis en geles de acril-amida.....	110
6.3.3.	Western blots y anticuerpos	110
6.3.4.	<i>Stripping</i>	111
6.3.5.	Ensayo de co-inmunoprecipitación	112
6.3.6.	Pulso y caza	113
6.3.7.	Análisis de la composición lipídica celular <i>in vivo</i>	113
6.4.	Análisis del glicano del GPI por espectrometría de masas	114
6.5.	Microscopía de fluorescencia	115
6.5.1.	Fluorescencia convencional	115
6.5.2.	<i>Super Resolution Confocal Live Image Microscopy (SCLIM)</i>	115
6.6.	Análisis estadístico	116
7.	BIBLIOGRAFÍA	117

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transporte intracelular _____	16
Figura 2. Ensamblaje de la cubierta COPII en la membrana del RE _____	17
Figura 3. Los ERES están íntimamente relacionados con el primer compartimento post-RE __	19
Figura 4. Las membranas de la ruta secretora temprana y tardía tienen una composición lipídica y unas propiedades físicas opuestas _____	22
Figura 5. Organización de dominios lipídicos en la membrana _____	25
Figura 6. Balsas lipídicas y proteínas ancladas a GPI _____	26
Figura 7. Estructura del GPI _____	27
Figura 8. Biosíntesis del precursor del GPI y su transferencia a la proteína aceptora en la membrana del RE en levaduras _____	28
Figura 9. Las proteínas ancladas a GPI son segregadas del resto de proteínas de superficie durante su transporte a lo largo de la ruta secretora _____	29
Figura 10. Las proteínas ancladas a GPI son exportadas del RE por una maquinaria COPII especializada _____	30
Figura 11. La organización estructural de las proteínas de la familia p24 depende de la oligomerización de sus subunidades _____	32
Figura 12. La remodelación del GPI regula activamente el reclutamiento de una cubierta COPII especializada _____	34
Figura 13. Remodelación lipídica de las proteínas ancladas a GPI _____	35
Figura 14. Síntesis de ceramida en levaduras _____	36
Figura 15. Transporte de ceramida desde el RE hacia el Golgi en levaduras _____	37
Figura 16. Modelo: Las ceramidas de cadena muy larga C26 promoverían la formación de clusters de proteínas ancladas a GPI y su segregación previa exportación del RE _____	39
Figura 17. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP forma clusters y es segregada del resto de proteínas transmembrana en la membrana del RE _____	44
Figura 18. El clustering y sorting de las proteínas ancladas a GPI depende de la longitud de las ceramidas libres presentes en la membrana del RE _____	46
Figura 19. El clustering de Gas1-GFP depende de su interacción con el receptor p24 _____	47
Figura 20. La ceramida se encuentra enriquecida alrededor de la porción citosólica del tallo transmembrana de Emp24 _____	49
Figura 21. Modelo: Clustering y sorting de las proteínas ancladas a GPI dependiente de las ceramidas muy largas C26 _____	50

Figura 22. La delección de CWH43 causa acumulación de la forma de RE de Gas1 _____	56
Figura 23. Las cepas mutantes <i>bst1Δ</i> y <i>Cwh43Δ</i> son defectivas en la formación de clusters de Gas1-GFP _____	57
Figura 24. Los esfingolípidos complejos son sintetizados de forma normal en el mutante <i>cwh43Δ</i> _____	58
Figura 25. La mutación <i>gpi7Δ</i> suprime el defecto de interacción entre Gas1-GFP y el complejo p24 causado por la delección de CWH43 _____	60
Figura 26. La mutación <i>gpi7Δ</i> suprime la acumulación de la forma de RE de Gas1 causada por <i>cwh43Δ</i> _____	61
Figura 27. La mutación <i>gpi7Δ</i> es incapaz de restaurar el defecto de exportación de Gas1 causado por <i>emp24Δ</i> _____	62
Figura 28. Análisis estructural del glicano del GPI de Gas1-GFP. _____	64
Figura 29. La tasa de degradación de Gas1 no se vio afectada en el mutante <i>cwh43Δ</i> _____	65
Figura 30. El mutante <i>gpi7Δ</i> anula la dependencia de ceramida para el transporte de las proteínas ancladas a GPI _____	67
Figura 31. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP que contiene DAG falla en la formación de clusters en el RE _____	68
Figura 32. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP con DAG entra en los mismos ERES que la proteína transmembrana Mid2-iRFP _____	70
Figura 33. El marcador de mayor longitud mRFP-WALP29 muestra un patrón punteado que co-localiza con los clusters de Gas1-GFP _____	74
Figura 34. Generación de la construcción mutante <i>Emp24-Inv</i> _____	75
Figura 35. Gas1 es retenido en el RE en el mutante <i>emp24Δ Emp24-Inv</i> _____	76
Figura 36. Gas1-GFP es incapaz de interactuar con la versión mutante del receptor <i>Emp24-Inv</i> _____	77
Figura 37. El mutante <i>Emp24-Inv</i> afecta a la generación de clusters de Gas1-GFP _____	78
Figura 38. La ausencia de ceramida mejora el transporte de <i>Cwp2-VENUS</i> en <i>Emp24-Inv</i> _____	79
Figura 39. Modelo: Control de calidad sobre la segregación selectiva de las proteínas ancladas a GPI mediada por lípidos _____	87
Figura 40. Modelo: Segregación de proteínas ancladas a GPI dependiente de la longitud del lípido mediado por el receptor p24 _____	89

ABREVIATURAS

Acyl-PI	Acil-fosfatidilinositol
COPI	Cubiertas COPI (<i>COat Protein Complex I</i>)
COPII	Cubiertas COPII (<i>COat Protein Complex II</i>)
CPY	Carboxipeptidasa Y
DMSO	Dimetil sulfóxido
DRM	Membranas resistentes a detergentes (<i>Detergent resistant membranes</i>)
dNTP	Desoxiribonucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilen-diamino tetraacético (<i>EthyleneDiamine Tetraacetic Acid</i>)
ERAD	Degradación asociada al RE (<i>ER Associated Degradation</i>)
ERES	Sitios de salida del RE (<i>ER Exit Sites</i>)
ERGIC	Compartimento intermedio (<i>ER-to-Golgi intermediate Compartment</i>)
EtNP	Etanolaminafosfato (<i>Ethanolamine-phosphate</i>)
GAP	Proteína aceleradora de la actividad GTPasa (<i>GTPase Accelerating Protein</i>)
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GlcN	Glucosamina
Golgi	Aparato de Golgi
GPI	Glicosil-fosfatidilinositol (<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>)
GST	Glutación-S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)1-piperazina-etanosulfónico
IPC	Inositol-fosfoceramida (<i>InositolPhospho-Ceramide</i>)
LCB	Bases de cadena larga (<i>Long Chain Bases</i>)

Man	Manosa
MIPC	Manosa-inositolfosfoceramida
M(IP)₂C	Inositolfosfo-manosa-inositolfosfo-ceramida
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
pG1	Fosfatidilinositol
PI	Fosfatidilinositol
PM	Membrana plasmática (<i>Plasma Membrane</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>PhenylMethylSulfonyl Fluoride</i>)
RE	Retículo endoplásmico
SC	Medio de cultivo sintético completo para levaduras (<i>Synthetic Complete</i>)
SCLIM	<i>Super Resolution confocal Live-Imaging Microscopy</i>
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (<i>SDS PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>)
TGN	Red Trans-Golgi (<i>Trans Golgi Network</i>)
TMD	Dominio transmembrana (<i>Transmembrane Domain</i>)
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano
TX-100	Tritón X-100
VLCFA	Ácidos grasos de cadena muy larga (<i>Very Long Chain Fatty Acids</i>)
WB	<i>Western Blot</i>
Wt	Silvestre (<i>Wild type</i>)
YNB	Bases nitrogenadas de levaduras (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)
YPD	Medio de cultivo completo para levaduras (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)

Nota Bene → Debido a la ausencia de términos que abarquen de forma correcta el significado de los siguientes conceptos y la dificultad de adaptar tales expresiones al español, las siguientes palabras serán usadas en inglés de forma recursiva a lo largo del presente texto:

- *Sorting*: exportación y transporte selectivo a lo largo de la ruta secretora de las distintas proteínas o especies lipídicas que repercute de forma directa en el destino funcional.
- *Clustering*: Segregación lateral y agrupación selectiva de determinados componentes de la membrana lipídica que los separa del resto.

RESUMEN

El transporte selectivo de proteínas a lo largo de la ruta secretora (*sorting*) es un proceso esencial para mantener la compartimentalización funcional y homeostasis de la célula eucariótica. Además de la maquinaria proteica de transporte vesicular, se ha sugerido que los lípidos de membrana también tienen un papel relevante en estos procesos. Recientemente hemos abordado esta cuestión fundamental investigando en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* el mecanismo molecular por el que las proteínas ancladas a GPI son segregadas en el RE del resto de proteínas de secreción y exportadas selectivamente en vesículas COPII específicas. Mediante el uso de la microscopía de superresolución in vivo SCLIM pudimos mostrar que la proteína anclada a GPI modificada con ceramida C26 Gas1 forma *clusters* asociados a ERES específicos y que este proceso depende tanto de la ceramida C26 presente en la membrana del RE como de las proteínas transmembrana p24. Finalmente, nuestros estudios *in silico* de dinámica molecular sugerían que las ceramidas C26 podrían acumularse localmente en la hemicapa citosólica alrededor del TMD de la proteína p24, Emp24, siendo a la vez excluidas de la hemicapa luminal. Estos resultados nos permitieron proponer un modelo en el cual el complejo transmembrana p24 estaría directamente involucrado en el *sorting* de las proteínas ancladas a GPI al favorecer la generación de dominios lipídicos enriquecidos en ceramida C26 en la membrana del RE. En primer lugar, los datos obtenidos demuestran la relevancia funcional tanto de la ceramida C26 presente en el GPI como del TMD de la proteína p24, Emp24, en los procesos de *clustering* y *sorting* de Gas1 en el RE. Además, también sugieren que los *clusters* de Gas1 se localizan en zonas donde la bicapa lipídica del RE adquiere un mayor grosor. En conjunto, estos resultados apoyan la idea general de que son las proteínas transmembranas las que reclutan lípidos específicos para explotar sus propiedades biofísicas emergentes y así iniciar el proceso de *sorting*, y no al revés como propone el modelo clásico de las balsas lipídicas en la que son los lípidos, ya auto-ensamblados en un dominio lipídico, quienes reclutan a las proteínas. Por último, nuestro estudio revela la existencia de un nuevo sistema de control de calidad que garantiza la segregación y exportación diferencial a través de ERES específicos de Gas1, lo que pone de manifiesto la relevancia fisiológica de la ruta de transporte selectivo de las proteínas ancladas a GPI dependiente de las ceramidas. En definitiva, los resultados presentados en esta tesis contribuyen a comprender mejor el papel de los lípidos de membrana en el *sorting* de las proteínas en la ruta secretora.

1. INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1.1. La ruta secretora

La vida eucariota depende de la organización espaciotemporal de los sistemas de membrana celulares, los cuales se encuentran definidos por una composición lipídica y proteica determinada. Esta organización y composición específica se alcanza en gran medida gracias a la actividad de la ruta secretora, la cual se encarga de fabricar y transportar la mayoría de los lípidos de membrana y alrededor de un tercio del proteoma celular hasta los diferentes destinos funcionales dentro o fuera de la célula (Bonifacino & Glick, 2004). Así, alteraciones en el correcto funcionamiento de la ruta secretora acarrearán importantes problemas para la fisiología celular dando lugar a numerosas y graves enfermedades humanas.

La ruta secretora consiste en una serie de compartimentos membranosos especializados comunicados por mediadores túbulo-vesiculares que participan en el mantenimiento de su identidad molecular (Figura 1). Esta se inicia en el retículo endoplásmico (RE), donde las proteínas de secreción recién sintetizadas y correctamente plegadas son selectivamente incorporadas en vesículas lipídicas que las transportarán a la siguiente estación, el aparato de Golgi, donde sufren una serie de modificaciones post-traduccionales (Ellgaard & Helenius, 2003; Smith et al., 2011). Una vez alcanzan el compartimento más distal o TGN (*Trans Golgi Network*), las proteínas son segregadas y enviadas en intermediarios de transporte vesiculares a su destino final, ya sea la membrana plasmática, los endosomas, la vacuola, los peroxisomas o los gránulos de secreción de ciertas células especializadas (Emr et al., 2009; Glick & Nakano, 2009).

Este transporte anterógrado se encuentra compensado por un transporte vesicular retrógrado, el cual ayuda a devolver aquellas proteínas que han escapado de su lugar de residencia y contribuye a reciclar los factores de transporte requeridos para futuras rondas de tráfico anterógrado (Figura 1). Este carácter bidireccional de la ruta secretora, en el que ambos tipos de transporte son interdependientes, no solo mantiene la identidad estructural de los orgánulos, sino que también garantiza que actúen de forma coordinada (Lee et al., 2004).

INTRODUCCIÓN

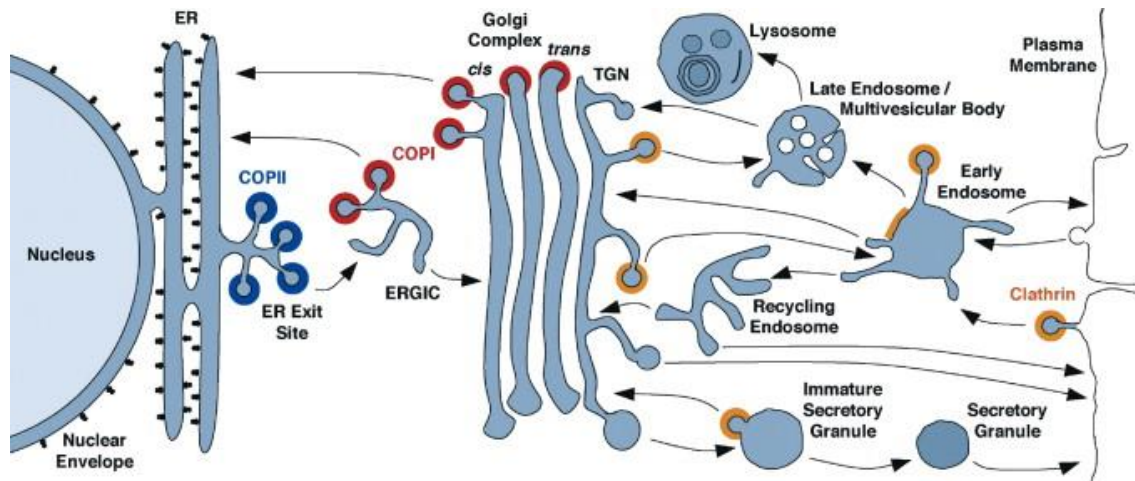


Figura 1. Transporte intracelular

El esquema representa los diferentes compartimentos que componen la ruta secretora y endocítica. El flujo de transporte se encuentra indicado por flechas. Los colores representan la localización de las principales cubiertas responsables de la formación de las vesículas. La cubierta COPII (azul) media el transporte desde el RE hacia el aparato de Golgi. La cubierta COPI (rojo) está involucrada en el transporte retrógrado entre las distintas cisternas del Golgi así como el transporte Golgi-RE. Los transportadores de clatrina (naranja) son responsables del transporte post-Golgi. Figura extraída de (Bonifacino & Glick, 2004).

1.1.1. Formación y ensamblaje de vesículas de transporte COPII

Una vez las proteínas han completado su síntesis, maduración y plegamiento en el RE, están listas para ser exportadas al Aparato de Golgi en vesículas COPII. Estas vesículas de transporte se forman cuando el complejo proteico citosólico de cubierta COPII deforma la membrana del RE en unos dominios especializados denominados sitios de salida o ERES (*ER Exit Sites*) (Figura 2). Tras su escisión, estas vesículas COPII se fusionan con la membrana del Golgi, liberando allí su carga y completando el primer paso del transporte anterógrado (Barlowe & Miller, 2013).

El ensamblaje comienza con el reclutamiento de la GTPasa monomérica Sar1, la cual es activada gracias a la proteína integral de membrana Sec12, que actúa como GEF (*Guanosine Exchange Factor*) de Sar1 produciendo el intercambio de GDP por GTP (Barlowe & Schekman, 1993). Una vez activada, Sar1 despliega una α -hélice anfipática que permite su integración en la membrana del RE (Lee et al., 2005). Sar1-GTP recluta a la capa interna de la cubierta, formada por el heterodímero Sec23-Sec24, gracias a su

interacción con la subunidad Sec23. Sec24 es la responsable de interactuar y capturar selectivamente al cargo, mientras que Sec23 actúa como proteína estimuladora de la actividad GTPásica (GAP: *GTPase Accelerating Protein*) de Sar1. Una vez formado este complejo cebador o *prebudding complex* constituido por Sar1-Sec23-Sec24-cargo, el heterotetrámero Sec13-Sec31 es reclutado a través de su interacción con Sec23 para formar la capa externa de la cubierta COPII (Sato & Nakano, 2005). Esta capa externa promueve curvatura y rigidez a la membrana, lo que favorece la formación de las vesículas, cuya escisión final depende de la hidrólisis de GTP por Sar1. Por su parte, se ha propuesto que Sec16 podría actuar como una plataforma para la formación de estas vesículas COPII al unir los distintos componentes de la cubierta, lo que podría contribuir a la organización de los ERES (Kurokawa & Nakano, 2019). Otros estudios sugieren que podría regular la formación de las vesículas COPII controlando la actividad GAP sobre Sar1 junto con Sec12 (Kung et al., 2012; Yorimitsu & Sato, 2012).

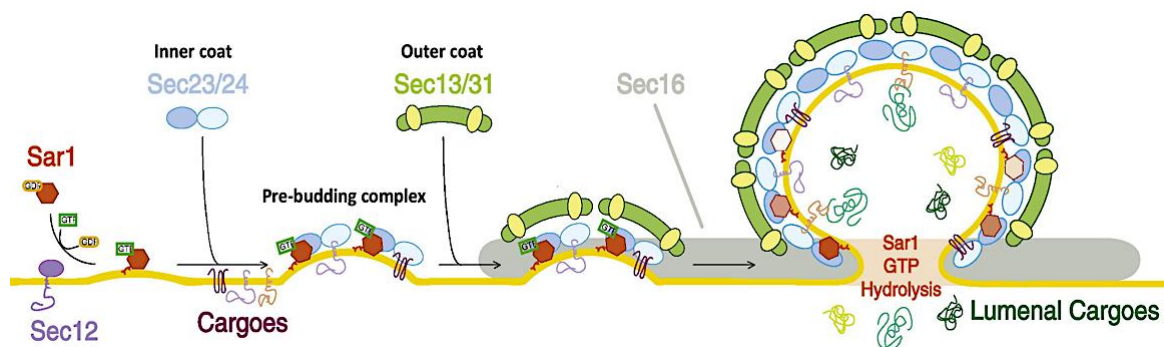


Figura 2. Ensamblaje de la cubierta COPII en la membrana del RE

El ensamblaje de esta maquinaria comienza con el reclutamiento de la GTPasa monomérica Sar1, que es cargada con GTP gracias a la proteína de membrana Sec12. Esto conduce a la inserción de Sar1 en la membrana del RE y el reclutamiento del heterodímero Sec23-Sec24, a través de la interacción con Sec23, dando lugar al complejo de *prebudding*. Mientras que Sec23 constituye la proteína activadora de la GTPasa, Sec24 es el elemento a través del cual la cubierta une los diferentes cargos. A continuación, se recluta el heterotetrámero Sec13-Sec31 que formará la capa externa de la envoltura y se encargará de dar rigidez y curvatura a la membrana, respectivamente. Cuando la cubierta se encuentra completamente ensamblada se alcanza el máximo de actividad de la GTPasa, dando lugar a la escisión de la vesícula. La proteína Sec16 ayuda a la formación de las vesículas actuando como plataforma para los diferentes componentes de la cubierta COPII. Figura adaptada de (D'Arcangelo et al., 2013).

INTRODUCCIÓN

1.1.2. Formación de los sitios de salida del retículo endoplásmico o ERES

A pesar de que la maquinaria de cubierta COPII ha sido caracterizada al detalle, los mecanismos que rigen la organización estructural y funcional de los ERES son aún desconocidos. El número y la organización espacial de los ERES difiere en distintas especies, pero parecen correlacionar con la organización del Aparato de Golgi (Figura 3). Las células de vertebrados contienen una única estructura compleja que conforma el Golgi, formando una cinta con todas las pilas de cisternas (*cis*, *medial* y *trans*), quedando estrechamente unidas las unas a las otras. Estas células muestran cientos de ERES en la membrana del RE distribuidos por toda la célula, por lo que la mayoría de ellos quedan lejos de las cisternas del Golgi, sin embargo, son capaces de interactuar funcionalmente con el compartimento intermedio ER-Golgi (ERGIC) (Budnik & Stephens, 2009). Por su parte, en la levadura *S. cerevisiae* el Golgi no se encuentra organizado en pilas, sino que las cisternas individuales se encuentran distribuidas por todo el citoplasma (Losev et al., 2006) y los ERES tienen una mayor probabilidad de encontrarse cerca de las cisternas *cis* que de las *trans* (Okamoto et al., 2012; Shindiapina & Barlowe, 2010). Es decir, esto sugiere que los ERES se encuentran íntimamente ligados al primer compartimento post-ER, lo que podría generar una unidad funcional para transportar el cargo desde el RE hacia el Golgi. Además, en *S. cerevisiae* los ERES muestran una alta colocalización con Rtn1, proteína que se encuentra en las zonas de alta curvatura en la membrana del RE, lo que sugiere que los ERES se organizan preferencialmente en dominios de alta curvatura (De Craene et al., 2006; Voeltz et al., 2006). Es más, se ha observado que los ERES aparecen concretamente, en zonas del RE que poseen tanto curvatura negativa como positiva, probablemente debido a la presencia de lípidos con diferentes estructuras. Dado que la formación de vesículas requiere no solo curvatura positiva, sino también negativa para constreñir el cuello de la vesícula naciente, estas zonas del RE donde preferentemente se forman los ERES podrían facilitar la formación de vesículas COPII (Okamoto et al., 2012).

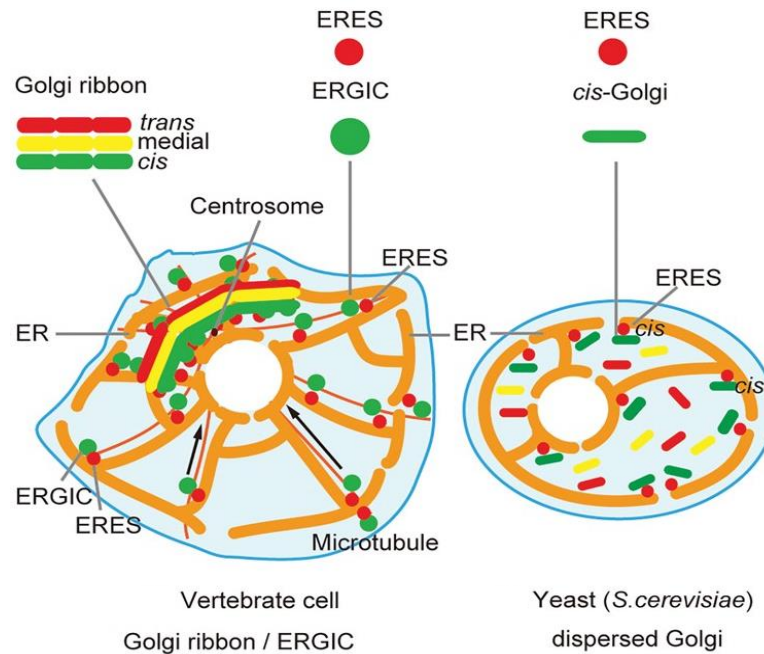


Figura 3. Los ERES están íntimamente relacionados con el primer compartimento post-RE

El aparato de Golgi en células de vertebrados se representa como una única cinta, compuesta por cisternas *cis*, *medial* y *trans* conectadas estrechamente las unas a las otras. Los ERES se encuentran representados como puntos rojos en la membrana del RE, la mayoría de los cuales parecen distantes de las cisternas del Golgi, pero cerca del ERGIC (puntos verdes). En las células de *S. cerevisiae* las cisternas del Golgi se encuentran distribuidas por todo el citoplasma, donde las cisternas *cis* (verde) se encuentran habitualmente cerca de los ERES (puntos rojos), los cuales están localizados en las regiones de alta curvatura del RE. Figura adaptada de (Kurokawa & Nakano, 2019).

1.2. *Sorting* de proteínas en la ruta secretora

El proceso para dirigir cada proteína individual a su localización funcional específica dentro de la célula se conoce como *sorting* de proteínas y es esencial para el mantenimiento de la compartimentalización celular y la homeostasis. Para realizar su función correctamente las proteínas deben alcanzar su destino final, de hecho, se sabe que un gran número de enfermedades, desde genéticas hasta neurodegenerativas, están relacionadas directa o indirectamente con fallos en los procesos de *sorting*. De esta manera, entender los mecanismos que rigen este *sorting* de proteínas a través de la ruta secretora se ha convertido en un objetivo de gran importancia tanto en la investigación básica como biomédica.

INTRODUCCIÓN

1.2.1. *Sorting* de proteínas mediado por secuencias señal

En la ruta secretora las proteínas son transportadas entre los diferentes orgánulos gracias a transportadores como las vesículas lipídicas. Sin embargo, los mecanismos de *sorting* por los cuales las diferentes proteínas son incorporadas en las vesículas de transporte de forma selectiva no están completamente establecidos. Se sabe que algunas proteínas de secreción altamente abundantes, como la albúmina, se incorporan en las vesículas de forma pasiva e inespecífica por un proceso denominado *Bulk Flow* (Thor et al., 2009), no obstante, la mayoría de proteínas dependen de una señal de *sorting* específica presente en su secuencia de aminoácidos (aa). Esta secuencia señal es reconocida directa o indirectamente por los componentes de la cubierta, lo que permite su incorporación en las vesículas nacientes.

En el caso de las vesículas COPII es la subunidad Sec24 la encargada del reclutamiento selectivo del cargo. Sec24 contiene diferentes dominios o bolsillos en su superficie capaces de reconocer distintas secuencias señal (Miller et al., 2003). Además, la existencia de diferentes isoformas (Sec24A-D en mamíferos y Lst1/Sfb3 y Iss1/Sfb2 en levaduras) aumenta aún más el repertorio de cargos distintos que la cubierta es capaz de incorporar en las vesículas. En el caso de las proteínas que no pueden interactuar directamente con la cubierta, bien porque son completamente luminales o bien porque carecen de las señales adecuadas, existe una gran variedad de receptores de cargo que reconocen a estas proteínas y las conectan con Sec24 (D'Arcangelo et al., 2013; Geva & Schuldiner, 2014). Aun así, esta amplia diversidad por parte de la cubierta a la hora de interactuar selectivamente con distintos tipos de cargos es insuficiente para explicar el *sorting* de la inmensa cantidad de proteínas diferentes que son sintetizadas en el RE, lo que sugiere la existencia de mecanismos de *sorting* adicionales.

1.2.2. *Sorting* de proteínas mediado por la composición lipídica diferencial de la membrana

La existencia de proteínas de secreción sin señal de *sorting* conocida indican que debe existir algún mecanismo adicional que contribuya a este fenómeno. En este sentido, se ha propuesto que la interacción de las proteínas con el entorno lipídico de las membranas podría jugar un papel importante. Este proceso dependería de las características físico-químicas de las proteínas de membrana y su interacción con las propiedades heterogéneas de las membranas de los distintos compartimentos.

1.2.2.1. Composición lipídica de las membranas a lo largo de la ruta secretora

Los distintos orgánulos a través de la ruta secretora poseen diferencias significativas en su composición lipídica, lo cual contribuye a definir tanto su forma como sus funciones especializadas. Por tanto, la identidad de un compartimento dado dentro de la célula no solo se encuentra definido por la combinación de proteínas que lo forman, ya que las diferentes especies de lípidos pueden afectar a características físicas generales tales como la fluidez, el grosor, el grado de empaquetamiento, la carga superficial o, incluso, la curvatura de las membranas (Harayama & Riezman, 2018; van Meer et al., 2008) .

La composición lipídica de los diferentes compartimentos viene dada por la combinación de las tres principales categorías de lípidos de membrana en eucariotas: fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides (Holthuis & Menon, 2014).

El RE, el primer paso en la ruta secretora, no solo es el principal productor de proteínas de la célula, sino que también se encarga de sintetizar la gran mayoría de los lípidos. En este orgánulo se fabrican una gran cantidad de fosfolípidos y esteroides, así como la ceramida, el precursor de los esfingolípidos. El RE proporciona la mayor parte de los lípidos de membrana tanto al Golgi como a la membrana plasmática, dada su baja capacidad de generar sus propios lípidos. Sin embargo, a pesar de este intercambio de material constante, estos orgánulos presentan claras diferencias en la composición de

INTRODUCCIÓN

sus membranas. En primer lugar, los esteroides se encuentran en muy baja cantidad en el RE, a pesar de ser su lugar de producción, mientras que son bastante abundantes en el TGN y la membrana plasmática (van Meer et al., 2008). Por su parte, los esfingolípidos son sintetizados en el lumen del TGN gracias a la ceramida proporcionada por el RE y suelen acumularse en la membrana plasmática, al igual que los esteroides, mientras mantienen niveles bajos en el RE (Holthuis et al., 2001). Además, los fosfolípidos de la membrana plasmática contienen acilos más largos y saturados que los presentes en el RE (Figura 4).

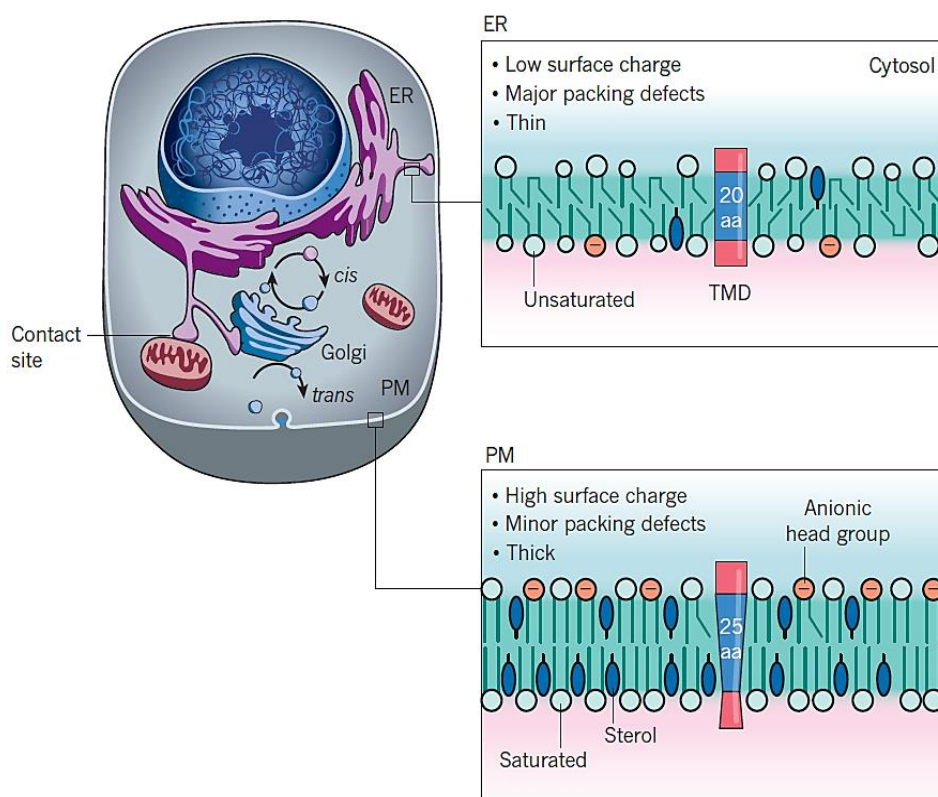


Figura 4. Las membranas de la ruta secretora temprana y tardía tienen una composición lipídica y unas propiedades físicas opuestas

El RE posee membranas delgadas y poco empaquetadas con una carga neutra en la cara citoplásmica, cualidades adaptadas a sus funciones biosintéticas. Por su parte, la membrana plasmática, de manera contraria, es más gruesa, presenta un mayor empaquetamiento lipídico y cargas negativas en la cara citoplásmica, contribuyendo a sus funciones de barrera biológica. Este contraste en sus propiedades físicas se ve reflejado en la longitud (20 aa y 25 aa, respectivamente) y geometría de los dominios transmembranas (TMD) de sus proteínas residentes. Figura adaptada de (Holthuis & Menon, 2014).

De esta manera, se genera un gradiente de composición lipídica desde una membrana delgada y poco empaquetada como la del RE, hacia membranas más gruesas y con un alto grado de empaquetamiento gracias a la sucesiva acumulación de especies lipídicas saturadas como los esfingolípidos y los esteroides, que contribuyen a proporcionar rigidez a la membrana plasmática favoreciendo sus funciones de barrera biológica.

Este cambio en el grosor de las membranas debido al aumento en la concentración de esfingolípidos y esteroides se ve reflejado en la longitud y composición de los dominios transmembrana (TMDs) de las proteínas a lo largo de la ruta secretora. Los TMDs de las proteínas residentes en el RE y Golgi son significativamente más cortos que los de la membrana plasmática (Sharpe et al., 2010).

1.2.2.2. Segregación lateral de lípidos como mecanismo de *sorting*

Para mantener esta organización diferencial de la composición lipídica a lo largo de la ruta secretora, los lípidos deben ser segregados de forma específica a su lugar de destino, al igual que las proteínas de secreción. El transporte lipídico entre compartimentos puede ocurrir, bien por transporte vesicular, o bien a través de proteínas transportadoras, las cuales suelen operar en los sitios de contacto entre las membranas del orgánulo aceptor y el donador (Holthuis & Menon, 2014). En este sentido, las vesículas pueden actuar como transportadores bidireccionales de una gran cantidad de lípidos, como constituyentes básicos de su propia membrana, lo cual podría contribuir en la segregación lipídica, por ejemplo, mediante la incorporación selectiva de esfingolípidos y esteroides en el transporte anterógrado o la exclusión de estos en el transporte retrógrado (Contreras et al., 2012). De hecho, ha sido demostrado que las vesículas de transporte retrógrado COPI se encuentran depletadas en colesterol y esfingomielina en células de mamífero, promoviendo la acumulación de esteroides y esfingolípidos aguas arriba del TGN (Brügger et al., 2000). Además, análisis lipídicos revelaron que las vesículas de transporte anterógrado contenían mayores niveles de esteroides y esfingolípidos que su orgánulo donador en células de levadura (Klemm et al., 2009). Esta acumulación selectiva de ciertos lípidos en las vesículas de transporte podría estar mediado por sus propiedades físico-químicas intrínsecas.

INTRODUCCIÓN

Los lípidos con ácidos grasos largos y saturados hacen a la membrana más gruesa y menos fluida debido al alto empaquetamiento de sus colas hidrofóbicas e interacciones lípido-lípido más fuertes. De manera contraria, los lípidos insaturados previenen este empaquetamiento. En membranas artificiales, los lípidos saturados, los insaturados y el colesterol segregan en diferentes fases generando regiones con un alto empaquetamiento lipídico, conocidas como regiones de lípidos ordenadas (Lo: *Liquid-ordered domains*), o regiones más desordenadas y fluidas (*liquid-disordered domains*) (van Meer et al., 2008)(Figura 5A). Esta separación local en fases constituye la base de la teoría altamente debatida de las balsas lipídicas, la cual defiende que la interacción preferencial entre esfingolípidos y esteroides por puentes de hidrógeno podría favorecer la formación de dominios lipídicos altamente empaquetados que flotarían en un entorno más fluido de fosfolípidos insaturados (Sezgin et al., 2017). Estas balsas lipídicas favorecerían la formación de *clusters* de determinadas proteínas en estos dominios especializados de lípidos ordenados lo cual contribuiría al *sorting* de las proteínas de secreción a su localización celular específica (Simons & Sampaio, 2011). Es más, se sabe que la longitud del TMD de las proteínas debe coincidir con el grosor de su membrana de residencia (Bretscher & Munro, 1993). Dado que se piensa que estas balsas lipídicas presentan un mayor grosor que la membrana que los rodea, este desfase hidrofóbico favorecería que proteínas con TMDs largos segregaran junto a estos dominios lipídicos a lo largo de la ruta secretora (Figura 5B).

Sin embargo, la existencia de estos dominios aún no ha sido demostrada por observación directa en células vivas (Levental & Veatch, 2016). Estas balsas lipídicas son habitualmente definidas por su resistencia a la extracción con detergentes in vitro, siendo encontradas en las fracciones de membrana resistentes a detergentes (DRM) (Brown & Rose, 1992; Schuck et al., 2003). No obstante, los tratamientos con detergentes pueden alterar su composición o incluso inducir esta separación en fases, por lo que los DRM no deben ser equiparados con las balsas lipídicas. Es más, resultados recientes sugieren que serían las propias proteínas las que reorganizarían los lípidos en torno a su TMD para evitar la exposición de sus residuos hidrofóbicos, actuando por tanto como cebadores en la generación de estos nanodominios, quedando los lípidos encargados de estabilizar y favorecer su expansión (Raghupathy et al., 2015) .

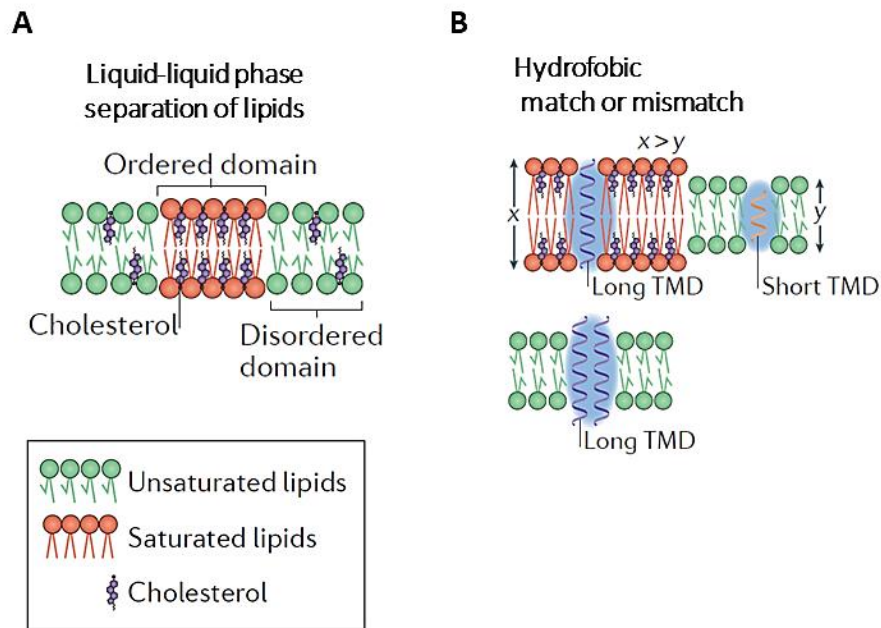


Figura 5. Organización de dominios lipídicos en la membrana

(A) Organización de los lípidos de membrana en fases dependiendo de su grado de saturación y longitud. Se generarían dominios ordenados constituidos por lípidos largos y saturados, incluyendo el colesterol, que se encontrarían inmersos en un entorno de lípidos desordenados, cortos e insaturados. **(B)** Las proteínas transmembrana localizan en aquellos dominios de membrana cuya longitud coincida con la de su dominio transmembrana (TMD). La exposición de residuos hidrofóbicos en las proteínas con TMD largos produciría un desajuste hidrofóbico lo que favorecería su localización en dominios de membrana más largos y ordenados. Figura adaptada de (Sezgin et al., 2017).

La hipótesis de las balsas lipídicas fue inicialmente postulada para explicar el *sorting* de ciertas proteínas desde el TGN hacia la membrana apical, la cual está enriquecida en esfingolípidos y colesterol a diferencia de la membrana basolateral de células epiteliales polarizadas en mamíferos (Simons & Ikonen, 1997).

Una de estas proteínas que segrega hacia la membrana apical son las proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), las cuales son proteínas luminales ancladas a la membrana a través de un glicolípido (Figura 6). Estas proteínas, debido a la presencia de lípidos de cadena saturada en la estructura del GPI, son encontradas en DRM, por lo que suelen ser consideradas como modelos para el estudio de la segregación de proteínas en balsas lipídicas (Pike, 2006).

INTRODUCCIÓN

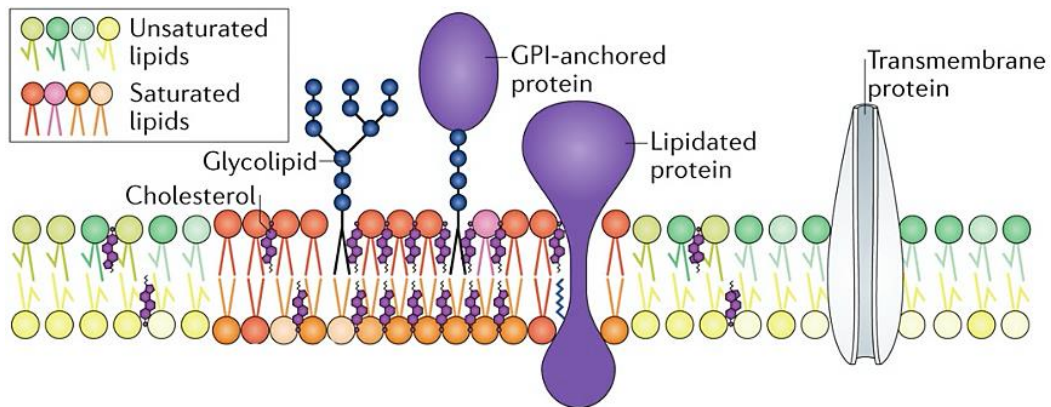


Figura 6. Balsas lipídicas y proteínas ancladas a GPI

Las balsas lipídicas son dominios de membrana pequeños, dinámicos y transitorios enriquecidos en fosfolípidos saturados, esfingolípidos, glicolípidos, esteroides y proteínas ancladas a GPI. El enriquecimiento de estos componentes hidrofóbicos proporciona a estos dominios lipídicos propiedades físicas determinadas, tales como un alto empaquetamiento lipídico y baja fluidez de membrana. Figura adaptada de (Sezgin et al., 2017).

En células epiteliales polarizadas de mamíferos, esta hipotética asociación de las proteínas ancladas a GPI con las balsas lipídicas se piensa que podría ser uno de los determinantes para su transporte hacia la membrana apical (Simons & Ikonen, 1997; Simons & Sampaio, 2011). Esta teoría es apoyada por el hecho de que la depleción de colesterol o la inhibición de la síntesis de esfingolípidos afecta a la localización de las proteínas ancladas a GPI en la membrana apical (Mays et al., 1995; Paladino et al., 2004). Sin embargo, la controversia sobre la existencia o no de dichas balsas lipídicas y su papel en la segregación de estas proteínas, hace necesaria la aportación de datos adicionales que respalden este mecanismo de *sorting* mediado por lípidos. Se sabe, que en células de levadura, estas proteínas ancladas a GPI son segregadas de forma prematura del resto de proteínas de secreción previa exportación del RE (Muñiz et al., 2001). El mecanismo que subyace bajo este *sorting* en el RE es aún desconocido, pero se sugiere que los lípidos podrían estar implicados. Por este motivo, las proteínas ancladas a GPI serán usadas como modelo en la presente tesis para esclarecer la posible existencia de un mecanismo de *sorting* de proteínas basado en lípidos.

1.3. Exportación de las proteínas ancladas a GPI del RE

Las proteínas ancladas a GPI constituyen una categoría particular de cargos luminales, los cuales están formados por una proteína soluble unida a través de una modificación post-traducciona, el glicolípido GPI, a la cara externa de la membrana plasmática. Esta modificación está conservada desde levaduras hasta humanos y juega un papel crucial no solo en su función, sino también en el transporte de estas proteínas a su destino final (Ferguson et al., 2009). En humanos se han encontrado más de 150 proteínas ancladas a GPI diferentes, cuyas funciones incluyen desde enzimas, moléculas de adhesión, receptores, inhibidores de proteasas, transportadores y reguladores del complemento. De esta manera, el anclaje a GPI es esencial para muchos procesos en mamíferos tales como, la embriogénesis, el desarrollo, la neurogénesis, la fertilización, e incluso el sistema inmune (Lebreton et al., 2018). Mutaciones en los genes involucrados en la remodelación de la parte lipídica del GPI están relacionadas con el desarrollo de enfermedades neurológicas. En el caso de levaduras, en concreto *Saccharomyces cerevisiae*, se han descrito más de 60 proteínas ancladas a GPI, siendo estas esenciales para su crecimiento.

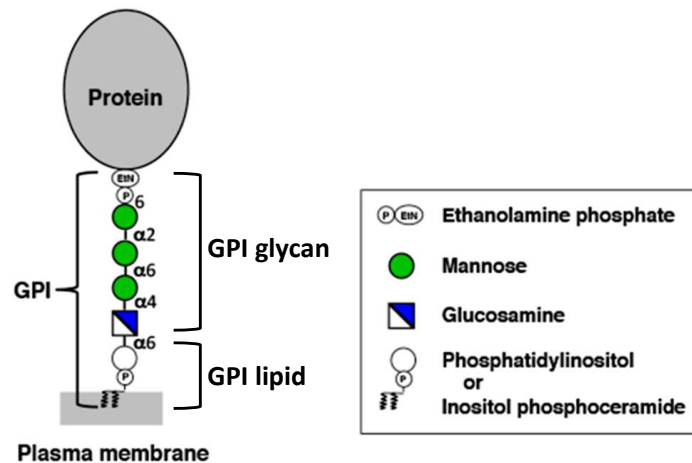


Figura 7. Estructura del GPI

La estructura altamente conservada del glicolípido GPI está compuesta por una parte glucídica y una parte lipídica. Glicano del GPI: una etanolamina fosfato a través de la cual se une la proteína, tres manosas y una glucosamina. Lípido del GPI: inositol fosfolípido. La proteína completa es anclada a la cara externa de la membrana plasmática a través de las cadenas de ácidos grasos del inositol fosfolípido. Figura adaptada de (Kinoshita & Fujita, 2016).

INTRODUCCIÓN

La estructura altamente conservada de este GPI consta de una parte lipídica, un fosfolípido, a la que se le une una cadena glucídica (Figura 7). Una vez que el precursor del GPI es sintetizado en la membrana del RE mediante una serie de reacciones que involucran más de 20 genes, este es transferido en bloque por una transamidasa a una proteína de nueva síntesis (Figura 8). Esta transamidasa reconoce la secuencia señal de anclaje a GPI en la región C-terminal de la proteína y corta por un sitio denominado sitio omega, donde quedará unida al precursor del GPI (Orlean & Menon, 2007). Inmediatamente después del anclaje a la proteína, las partes glucídicas y lipídicas del GPI sufren una serie de modificaciones por distintas enzimas de remodelación (Kinoshita & Fujita, 2016). Una vez remodeladas, las proteínas ancladas a GPI son exportadas del RE para ser dirigidas a su destino final en la membrana plasmática. En levaduras, algunas de estas proteínas son liberadas de su anclaje al GPI para ser incorporadas en la pared celular (Pittet & Conzelmann, 2007; Vazquez et al., 2014).

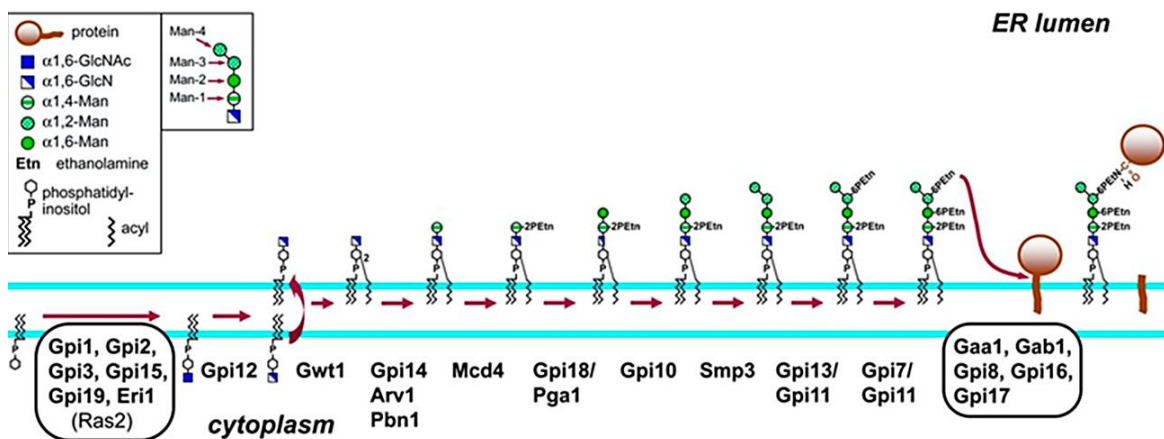


Figura 8. Biosíntesis del precursor del GPI y su transferencia a la proteína aceptora en la membrana del RE en levaduras

El GPI es sintetizado en el RE por una serie de reacciones en cadena que requiere al menos 11 pasos. A continuación, es transferido en bloque a la región C-terminal de la proteína gracias a una transamidasa que reconoce y corta la región omega de la proteína. Las enzimas Mcd4 y Gpi7 se encargan de añadir las EtNP de la primera y segunda manosa respectivamente, las cuales están ausentes en la proteína madura de la membrana plasmática. Figura adaptada de (Li et al., 2018).

Durante su transporte a lo largo de la ruta secretora las proteínas ancladas a GPI son segregadas y separadas del resto de proteínas que se dirigen a la superficie celular (Figura 9). En mamíferos, estos eventos de *sorting* tienen lugar en el Golgi durante su transporte desde el TGN hacia la membrana plasmática apical, mientras que en levaduras ocurre durante la salida del RE (Mayor & Riezman, 2004; Muñiz & Riezman, 2000). Esta característica especial viene dada por la adquisición del glicolípido GPI, el cual parece fomentar una asociación especial de estas proteínas ancladas a GPI con las membranas, donde los lípidos desempeñarían un papel importante en su segregación selectiva a lo largo de la ruta secretora.

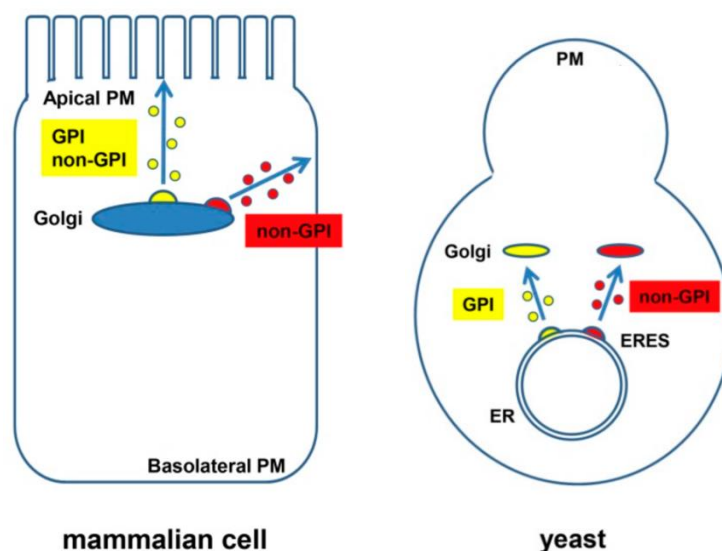


Figura 9. Las proteínas ancladas a GPI son segregadas del resto de proteínas de superficie durante su transporte a lo largo de la ruta secretora

En levaduras, el *sorting* tiene lugar antes de su salida del RE. Las proteínas ancladas a GPI recién sintetizadas son segregadas y concentradas en ERES específicos, siendo a continuación incorporadas en vesículas COPII especializadas que las transportarán hacia el Golgi. Existe la posibilidad de que estas proteínas ancladas a GPI continúen su viaje separadas del resto de proteínas de secreción en cisternas del Golgi diferentes hasta alcanzar su destino en la membrana plasmática, sin embargo, aún no hay evidencias que confirmen esta hipótesis. En células epiteliales polarizadas de mamíferos el *sorting* de las proteínas ancladas a GPI tiene lugar en el Golgi, durante el transporte desde el TGN hacia la membrana plasmática (PM). Las proteínas ancladas a GPI junto con otras proteínas que se dirigen a la membrana apical, son segregadas de las proteínas de la membrana basolateral en diferentes vesículas de transporte que siguen rutas separadas hacia la superficie celular. Figura extraída de (Muñiz & Riezman, 2016).

INTRODUCCIÓN

1.3.1. Requisitos específicos de la maquinaria de cubierta COPII para el transporte de las proteínas ancladas a GPI

Una vez remodeladas, las proteínas ancladas a GPI son incorporadas en vesículas COPII. Sin embargo, dado que son proteínas completamente luminales y no atraviesan la membrana del RE, requieren de un adaptador o receptor que los conecte con la cubierta. Este papel es desempeñado por la proteína p24, que une a las proteínas ancladas a GPI con Lst1, un parálogo de Sec24, la subunidad encargada de unir el cargo (Castillon et al., 2011; Manzano-Lopez et al., 2015; Miller et al., 2003) (Figura 10). Lst1 es específicamente requerido para la exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI y contiene sitios de unión para p24. Es más, la alteración de estos sitios de unión específicos resulta en la acumulación de las proteínas ancladas a GPI en el RE.

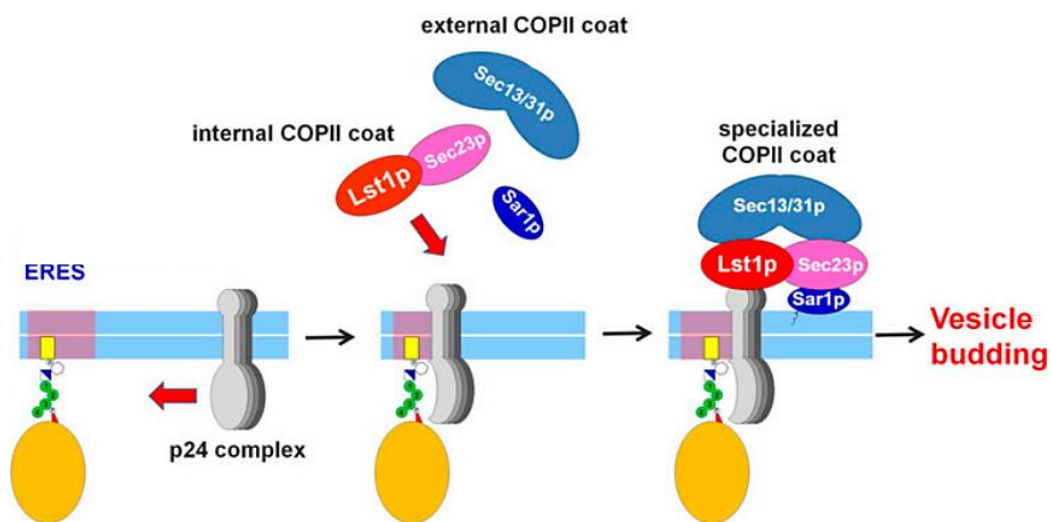


Figura 10. Las proteínas ancladas a GPI son exportadas del RE por una maquinaria COPII especializada

Esta maquinaria especializada involucra el receptor transmembrana p24 y la subunidad de cubierta COPII Lst1, un parálogo de Sec24 requerido específicamente para el transporte de las proteínas ancladas a GPI. El receptor p24 conecta las proteínas ancladas a GPI en el lumen del RE con la cubierta interna de COPII en el lado citosólico a través de su interacción con Lst1, el cual forma dímeros con Sec23. Una vez estabilizada en la membrana, la cubierta interna Lst1/Sec23 recluta la cubierta externa Sec13/Sec31, lo que promueve la formación y escisión de las vesículas COPII. Figura adaptada de (Muñiz & Riezman, 2016).

Esta necesidad de generar vesículas COPII especializadas parece estar relacionado con la naturaleza predominantemente luminal tanto del receptor p24, como de las propias proteínas ancladas a GPI (D'Arcangelo et al., 2013; Stachowiak et al., 2013). En 30

particular, cabe destacar la corta longitud del anclaje del GPI en relación al tamaño de su dominio luminal altamente glicosilado. Esta diferencia genera curvatura negativa en la membrana, que parece ser contrarrestada por la subunidad de cubierta externa Sec13, la cual proporciona rigidez a la cubierta COPII (Copic et al., 2012). Además, esta rigidez proporcionada por Sec13 parece estar ajustada por Lst1, que genera vesículas COPII con un mayor diámetro. De hecho, ha sido demostrado que las vesículas COPII generadas *in vitro* con una mezcla de Sec24 y Lst1 son ligeramente más grandes que aquellas que solo contienen Sec24 (Miller et al., 2003; Shimoni et al., 2000). Por tanto, Lst1 y Sec13 estarían proporcionando propiedades de ensamblaje específicas a la cubierta COPII, que podrían ser necesarias para la incorporación de cargos grandes, como es el caso de los *clusters* de proteínas ancladas a GPI y receptores p24, los cuales, como discutiremos más adelante, se encontrarían insertados en regiones de membrana más rígidas, enriquecidas en ceramida.

1.3.1.1. El receptor p24

Los miembros de la familia de proteínas p24 se asocian heteroméricamente para formar el denominado complejo p24. Gracias a su abundancia y capacidad para ciclar entre el RE y el Golgi uniendo fuertemente ambos tipos de cubiertas, COPI y COPII, ha sido relacionado con dos funciones esencialmente. La primera de ellas es la función específica como receptor de carga, facilitando la exportación selectiva del RE de las proteínas ancladas a GPI (Castillon et al., 2011; Muñiz & Riezman, 2000). La segunda función, de carácter general, está relacionada con el transporte retrógrado, ya que participa en la formación de vesículas COPI derivadas del Golgi a través de la estabilización de la cubierta COPI sobre las membranas (Aguilera-Romero et al., 2008; Sabido-Bozo et al., 2021).

Los análisis filogenéticos dividen a la familia p24 en cuatro subfamilias: p24 α , β , γ y δ (Carney & Bowen, 2004). En levadura, la subfamilia p24 α la componen Erp1, Erp5 y Erp6; la subfamilia p24 β , Emp24; la subfamilia p24 γ , Erp2, Erp3 y Erp4; y la subfamilia p24 δ , Erv25. No obstante, existe cierta redundancia funcional entre los miembros de las

INTRODUCCIÓN

subfamilias de una misma rama en levadura (Marzioch et al., 1999). Sin embargo, en organismos pluricelulares se han descrito patrones de expresión diferencial específicos de tejido, en los que los diferentes miembros de cada subfamilia no son intercambiables entre sí (Carney & Bowen, 2004; Strating & Martens, 2009).

Las proteínas p24 son proteínas transmembrana tipo I. Presentan un dominio luminal que contiene motivos de unión a proteínas carga y un tallo citosólico que muestra una gran afinidad para interactuar con los complejos de cubierta COPII y COPI, estando ambas regiones conectadas por un único dominio transmembrana (TMD). A pesar de que el tallo citosólico representa sólo un pequeño porcentaje de la proteína, de 12 a 20 aminoácidos, es en esta región donde se localizan las señales responsables del movimiento cíclico y de la localización del complejo p24 en la célula. En la fracción luminal se encuentran la secuencia señal necesaria para su translocación al RE, un dominio GOLD (*Golgi dynamics*) y una región *coiled-coil* (Figura 11). La región *coiled-coil*, que precede al TMD es esencial para la formación del complejo: heterotetrámeros (p24 α +p24 β +p24 γ +p24 δ) o heterodímeros (p24 β +p24 δ).

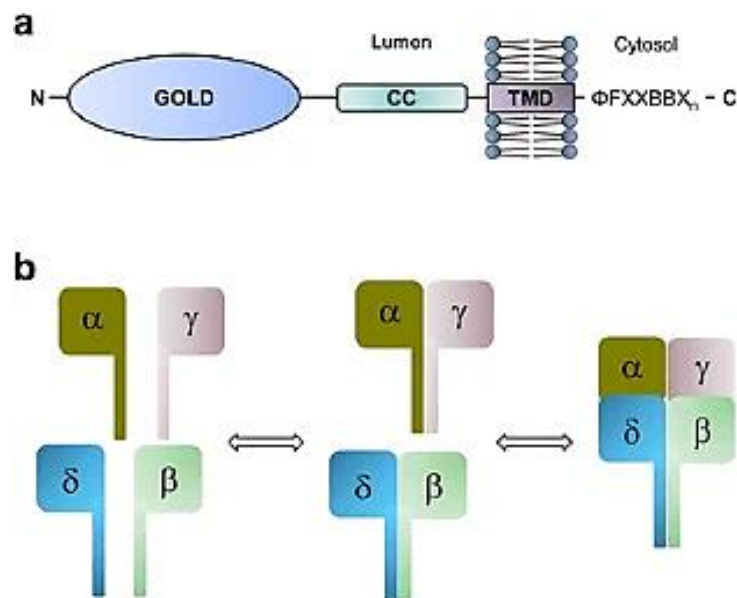


Figura 11. La organización estructural de las proteínas de la familia p24 depende de la oligomerización de sus subunidades

(A) Estructura de las proteínas p24, destacándose el dominio GOLD, la región *coil-coiled* (CC), el dominio transmembrana (TM) y el tallo citosólico (CT). **(B)** Los miembros de las diferentes familias interactúan a través de sus regiones *coil-coiled* para formar los complejos, ya sean heterodímeros o heterotetrámeros. Figura extraída de (Pastor-Cantizano et al., 2016).

La oligomerización del complejo p24 es esencial para la estabilidad de las propias proteínas p24 en la célula, así como para que el complejo pueda ciclar entre RE y Golgi (Füllekrug et al., 1999). En *S. cerevisiae* el complejo está formado principalmente por las proteínas Emp24, Erv25, Erp1 y Erp2. La eliminación tanto de Emp24 como de Erv25 genera complejos inestables, no funcionales, que terminan siendo degradados. De este modo, la eliminación de una de estas subunidades tiene como consecuencia la disminución de los niveles proteicos del resto de la familia (Marzioch et al., 1999).

1.3.1.2. Remodelación del glicano del GPI

El reconocimiento de las proteínas ancladas a GPI por parte del complejo p24 se encuentra regulado por la remodelación de la parte glucídica del GPI. Esta modificación consiste en la eliminación de la EtNP presente en la segunda manosa del glicano por la fosfodiesterasa Ted1 en levaduras y PGAP5 en mamíferos (Figura 12) (Fujita et al., 2009; Manzano-Lopez et al., 2015). De hecho, ha sido demostrado que p24 actúa como una lectina al reconocer de manera específica el glicano remodelado de las proteínas ancladas a GPI. Este reconocimiento por parte del receptor p24 dispara el reclutamiento y la estabilización de Lst1 a los ERES, con la consiguiente formación de vesículas COPII. Es decir, el reclutamiento de la cubierta COPII por parte del complejo p24 no ocurre de forma constitutiva, en su lugar, se encuentra activamente regulada por la unión de un cargo maduro. La existencia de un mecanismo regulatorio de este tipo ayudaría a entender como la producción de vesículas COPII se ajustaría a la cantidad de cargos luminales que se encuentran listos para salir del RE.

Además de esta EtNP presente en la segunda manosa, la cual es añadida durante la síntesis del precursor GPI por medio de la enzima Gpi7, el glicano presenta dos EtNP más (Figura 8). Una en la tercera manosa, a través de la cual se ancla la proteína luminal, y otra en la primera manosa, que al igual que ocurre con la EtNP de la segunda manosa, se encuentra ausente en la forma madura de la proteína. Se ha descubierto recientemente, que sería la enzima Cdc1, localizada en el Golgi, la que se encargaría de su eliminación antes de alcanzar su destino final en la membrana plasmática (Vazquez et al., 2014; Yang & Banfield, 2020).

INTRODUCCIÓN

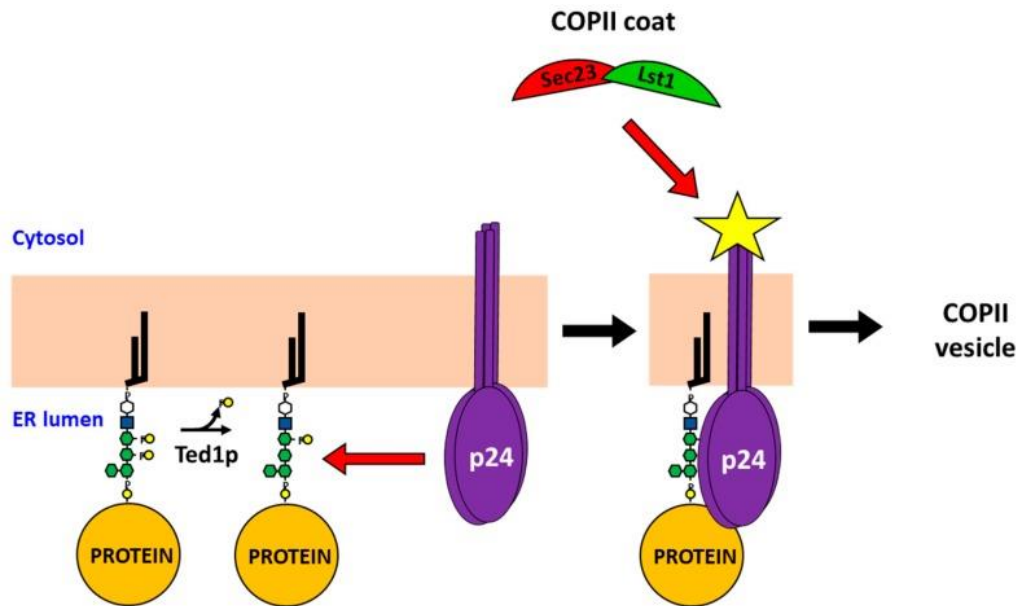


Figura 12. La remodelación del GPI regula activamente el reclutamiento de una cubierta COPII especializada

La eliminación de la EtNP de la segunda manosa del glicano del GPI por parte de Ted1 permite la interacción de las proteínas ancladas a GPI con el receptor p24. Esta unión promueve el reclutamiento selectivo de una cubierta interna COPII específica, formada por Lst1/Sec23, con la consiguiente formación de vesículas COPII. Este mecanismo implica que la formación de estas vesículas COPII especializadas se encuentra regulado por la cantidad de proteínas ancladas a GPI listas para ser exportadas. Figura extraída de (Lopez et al., 2019).

1.3.2. *Sorting* de las proteínas ancladas a GPI previa exportación del RE

Tradicionalmente se creía que todas las proteínas de secreción viajaban juntas en las mismas vesículas COPII desde el RE hasta el Golgi, donde serían segregadas a su destino final. Sin embargo, hoy día se sabe que las proteínas ancladas a GPI en levadura son segregadas del resto de proteínas de secreción previa exportación del RE, siendo incorporadas en vesículas COPII especializadas (Castillon et al., 2009; Muñoz et al., 2001). El mecanismo que subyace bajo este *sorting* de las proteínas ancladas a GPI en el RE es aún desconocido, pero se piensa que los lípidos podrían estar involucrados, por lo que la remodelación de la porción lipídica del GPI podría jugar un papel importante en este evento (Muñoz & Riezman, 2016).

1.3.2.1. Remodelación lipídica del GPI

En levaduras, esta remodelación lipídica del GPI comienza inmediatamente después del anclaje a la proteína (Pittet & Conzelmann, 2007). Esta consiste en la deacilación por parte de Bst1 (Tanaka et al., 2004) seguida de la remodelación de los ácidos grasos, lo cual implica el reemplazamiento de las cadenas cortas e insaturadas del diacilglicerol (C18:1), por unas más largas y saturadas (C26:0) (Bosson et al., 2006). A continuación, este diacilglicerol de C26 es en algunas ocasiones reemplazado por ceramida (C26:0) gracias a la enzima Cwh43 (Figura 13) (Fujita & Kinoshita, 2012; Umemura et al., 2007). De hecho, ha sido propuesto, que las proteínas ancladas a GPI que se dirigen a la membrana plasmática adquieren esta ceramida en su porción lipídica, mientras aquellas que se dirigen a la pared celular mantienen el diacilglicerol C26, como se ha demostrado en el caso de Gas1 y Cwp2, respectivamente. Por tanto, el tipo de lípido presente en el GPI (diacilglicerol o ceramida) podría contribuir a determinar su destino final en levaduras. El mecanismo implicado es aún desconocido, pero se cree que las secuencias diferenciales cercanas al Ω site de la proteína, donde el GPI es anclado, podrían estar relacionadas (Yoko-O et al., 2018).

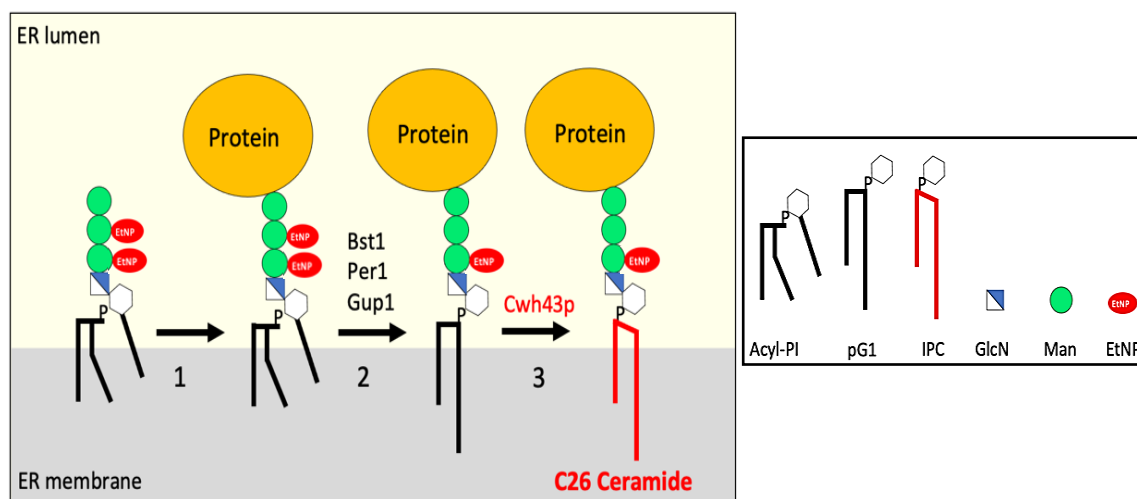


Figura 13. Remodelación lipídica de las proteínas ancladas a GPI

1) La proteína es anclada al GPI en el lumen del RE. **2)** El acilo unido al inositol es eliminado por la enzima Bst1. Después, la cadena de ácido graso insaturada en la posición sn2 es eliminada por Per1, y en su lugar una cadena muy larga y saturada (C26:0) es añadida por Gup1. **3)** En muchos casos el diacilglicerol es sustituido por ceramida por Cwh43. Acyl-PI: acil-fosfatidilinositol, pG1: fosfatidilinositol, IPC: inositolfosfo-ceramida, GlcN: glucosamida, Man: manosa y EtNP: etanolaminafosfato.

INTRODUCCIÓN

1.3.2.2. Síntesis y transporte de ceramida

La síntesis de ceramida tiene lugar en el RE, después de lo cual es transportada al Golgi para servir como precursor de la síntesis de esfingolípidos (Figura 14). Esta comienza con la síntesis de sus dos componentes, la esfingosina o bases de cadena larga (LCB) y los ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA). Por su parte, la esfingosina es generada por la condensación del aminoácido serina junto con el ácido graso de la Coenzima A, gracias a la serina-palmitoiltransferasa, comprendida por el heterodímero Lcb1/Lcb2 en levaduras. El otro componente es generado por la elongación de ácidos grasos de cadena larga (C12-C16) hasta obtener VLCFA de C18 o más gracias a las elongasas Elo1-3. La combinación de ambos componentes por las ceramidas sintasas Lag1 y Lac1, da lugar a las ceramidas, siendo las C26 las más abundantes en levadura (Olson et al., 2016).

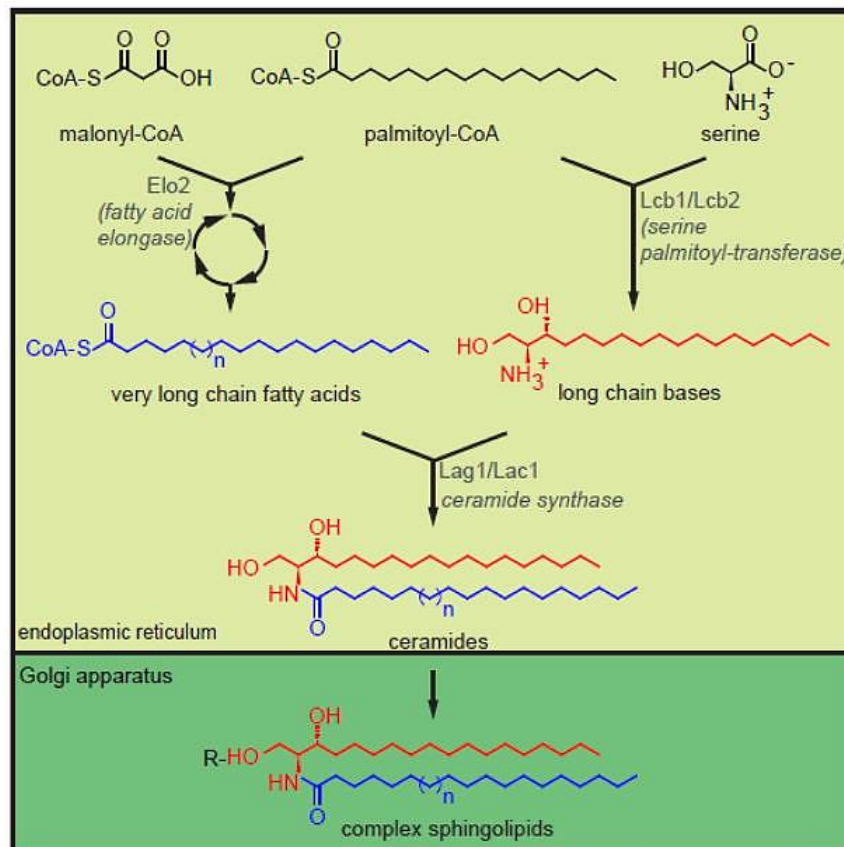


Figura 14. Síntesis de ceramida en levaduras

Principales pasos de la síntesis de ceramida. Se nombran las principales enzimas reguladoras. Las estructuras de LCB y VLCFA son representativas, dada la alta variabilidad comprendida por las posibles hidroxilaciones, insaturaciones y variaciones en la longitud de la cadena. Figura extraída de (Olson et al., 2016).

Una vez sintetizada, la ceramida es transportada al *cis*-Golgi principalmente mediante vesículas COPII (Funato et al., 2020). Más tarde, en el *medial*-Golgi es convertida en inositolfosfoceramida (IPC) por la enzima Aur1 y posteriormente manosilada hasta obtener MIPC y M(IP)₂C (Figura 15). Una pequeña proporción de ceramida (20-30%) es dirigida directamente al *medial*-Golgi vía no vesicular por el transportador Nvj2 (Liu et al., 2017).

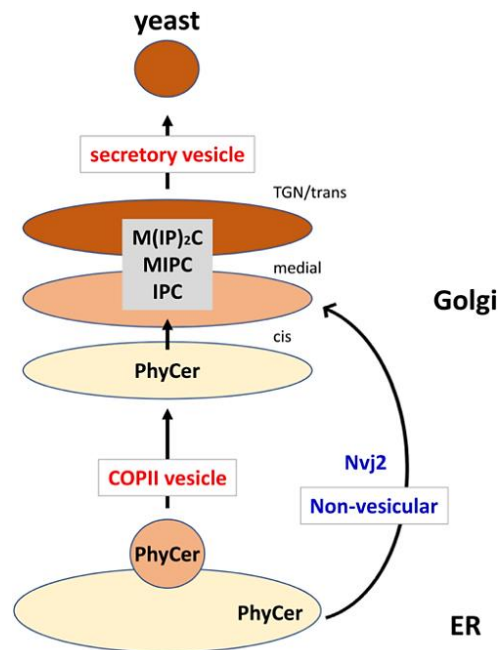


Figura 15. Transporte de ceramida desde el RE hacia el Golgi en levaduras

La ceramida C26 es sintetizada en el RE y es transportada principalmente mediante vesículas COPII al Aparato de Golgi, donde sirven como precursores para la síntesis de esfingolípidos complejos. Figura adaptada de (Funato et al., 2020).

Las ceramidas tienen propiedades biofísicas únicas, ya que son extremadamente hidrofóbicas y son capaces de formar extensas redes de puentes de hidrógeno debido a la presencia en su estructura de grupos donadores y aceptores, es decir, hidrógenos y átomos electronegativos (Alonso & Goñi, 2018; Castro et al., 2014). Estas propiedades confieren a la ceramida la capacidad de segregar en dominios ricos en ceramida, los cuales se encuentran altamente ordenados y empaquetados en la fase fluida de la membrana (Silva et al., 2006; Sot et al., 2006; Veiga et al., 1999). Estudios recientes han demostrado que la longitud de las cadenas de ácidos grasos de la ceramida tiene un impacto directo en las propiedades biofísicas de estos dominios, tales como, su grado

INTRODUCCIÓN

de empaquetamiento, forma, tamaño y grosor de la bicapa lipídica (Pinto et al., 2011; Zelnik et al., 2020). Dado que la ceramida se sintetiza en el RE, ha sido propuesto que estos dominios ordenados enriquecidos en ceramida podrían regular ciertas funciones del RE, por ejemplo, afectando al grado de difusión de las proteínas transmembranas, lo que incluso podría tener un impacto en su transporte a lo largo de la ruta secretora (Zelnik et al., 2020).

1.3.2.3. Modelo de *sorting* de las proteínas ancladas a GPI dependiente de ceramida

Estas propiedades biofísicas únicas de las ceramidas de cadena muy larga podrían tener un impacto en la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI que poseen ceramidas C26. De hecho, la remodelación lipídica del GPI es necesaria para su aislamiento en DRMs, lo cual ha sido propuesto como un reflejo de su asociación con estos dominios enriquecidos en ceramida (Castillon et al., 2011; Fujita, Umemura, et al., 2006). Estos resultados demuestran que la remodelación lipídica del GPI cambia las propiedades de las proteínas ancladas a GPI, probablemente afectando a su asociación funcional con la membrana. Es más, la síntesis de ceramida es requerida para la exportación del RE de las proteínas ancladas a GPI basadas en ceramida C26 (Horvath et al., 1994; Sütterlin et al., 1997) y, a su vez, la síntesis de IPC en el Golgi a partir de ceramida depende de la síntesis de GPI (Kajiwara et al., 2008), lo que sugiere que las proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramidas C26 y las ceramidas C26 libres se transportan al Golgi de forma interdependiente.

Teniendo en cuenta estos datos se ha propuesto un modelo mediante el cual, las proteínas ancladas a GPI con ceramidas C26 coalescerían junto con las ceramidas C26 libres en la membrana del RE, generando dominios ordenados dentro del entorno relativamente desordenado de lípidos de la membrana del RE, la cual está constituida principalmente por lípidos cortos e insaturados (C16:1 y C18:1) (Funato et al., 2020; Melero et al., 2018). La formación de estos dominios provocaría la segregación lateral de las proteínas ancladas a GPI basadas en ceramidas C26 del resto de proteínas transmembrana del RE. Finalmente, estas proteínas ancladas a GPI con ceramidas C26

junto con las ceramidas C26 de la membrana serían concentradas en ERES específicos para ser posteriormente incorporadas en vesículas COPII especializadas que las transporten hacia el Golgi (Figura 16) (Muñiz & Riezman, 2016).

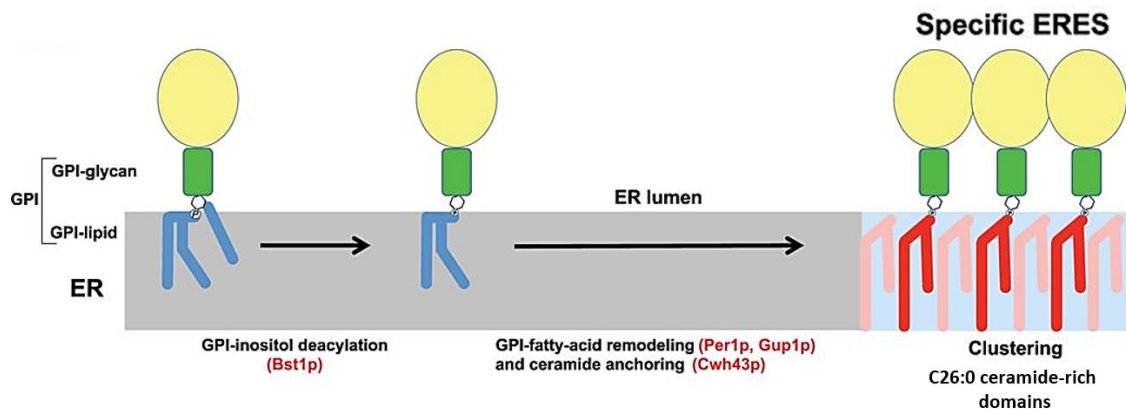


Figura 16. Modelo: Las ceramidas de cadena muy larga C26 promoverían la formación de clusters de proteínas ancladas a GPI y su segregación previa exportación del RE

Modelo de *sorting* de las proteínas ancladas a GPI por el cual la adquisición de ceramidas C26 tras la remodelación lipídica del GPI generaría un desajuste hidrofóbico en la membrana del RE llevando a la concentración de las proteínas ancladas a GPI en dominios ordenados ricos en ceramidas. Esta concentración dependiente de ceramida C26 conllevaría la segregación de las proteínas ancladas a GPI del resto de proteínas transmembrana, siendo incorporadas en ERES específicos. Figura adaptada de (Muñiz & Zurzolo, 2014).

INTRODUCCIÓN

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ANTECEDENTES

Con objeto de investigar el posible papel de los lípidos de membrana en el *sorting* de proteínas a lo largo de la ruta secretora, nuestro grupo de investigación ha estudiado en los últimos años la segregación en el RE de las proteínas ancladas a GPI del resto de proteínas de secreción y su exportación selectiva en vesículas COPII específicas. En concreto, se ha testado la hipótesis de que las ceramidas de cadena muy larga de 26 carbonos (C26) formen microdominios lipídicos en la membrana del RE que segreguen lateralmente a las proteínas ancladas a GPI y las incorporen selectivamente en ERES específicos distintos de los usados por las proteínas transmembranas para salir del RE (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

Para testar esta hipótesis, primero se optimizó un sistema genético que permitiera visualizar a nivel nanoscópico mediante microscopía de super-resolución la entrada de dos tipos de cargos en los ERES, por un lado, la proteína anclada a GPI Gas1 etiquetada con GFP (Gas1-GFP) y, por otro, la proteína transmembrana (TM) Mid2 etiquetada con iRFP (Mid2-iRFP). Estos dos cargos fueron co-expresados bajo un promotor inducible de galactosa para asegurar la visualización de cargo de nueva síntesis en el RE. Como marcador de los ERES se usó la proteína de la capa externa de la cubierta COPII Sec13 etiquetada con mCherry (Sec13-mCherry). La co-expresión inducida de las dos proteínas cargo fue llevada a cabo en un mutante termosensible *sec31-1*, en el que, a temperatura restrictiva (37 °C), se afecta la función esencial de Sec31, componente de la capa externa de la cubierta COPII, por lo que el cargo es retenido en el RE. El cambio a temperatura permisiva (24 °C) restaura la exportación del cargo recién sintetizado, permitiendo su entrada a los ERES. El microscopio de super resolución SCLIM (*Super-resolution Confocal Live Imaging Microscopy*) permitió visualizar a nivel nanoscópico, de forma simultánea y en 3D la incorporación de los cargos en los ERES. Utilizando este sistema avanzado de microscopía se observó que la proteína anclada a GPI Gas1-GFP y la proteína transmembrana Mid2-iRFP no co-localizan en la membrana del RE, presentando ambas patrones de distribución muy diferentes (Figura 17). Mientras Mid2-iRFP se distribuye homogéneamente por toda la membrana del RE, Gas1-GFP se concentra en zonas concretas formando *clusters* que están asociados a ERES específicos, lo que sugiere que

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

ambas proteínas cargo tras segregarse en la membrana del RE salen de este a través de ERES diferentes. Esta posibilidad fue confirmada al establecerse que, en efecto, la mayoría de los ERES contenía un solo tipo de cargo, o Gas1-GFP o Mid2-iRFP (Figura 18). Por tanto, los datos obtenidos indicaron que la formación de *clusters* asociados a determinados ERES le permite a Gas1-GFP segregarse y salir del RE a través de esos ERES específicos.

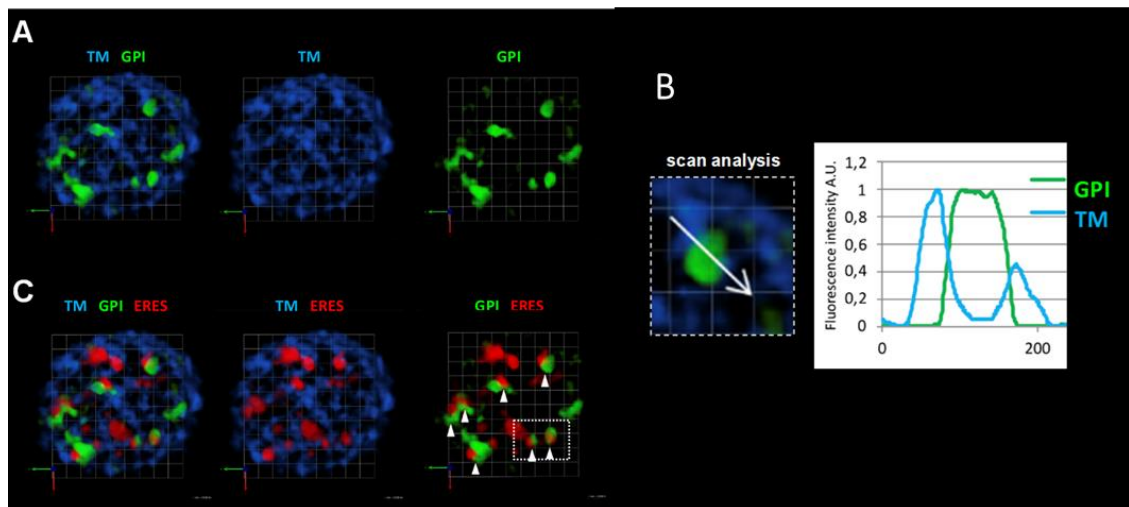


Figura 17. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP forma *clusters* y es segregada del resto de proteínas transmembrana en la membrana del RE

La cepa *sec31-1* que expresaba Gas1-GFP (verde) y Mid2-iRFP (azul) bajo un promotor inducible de galactosa, y Sec13-mCherry de forma constitutiva como marcador de ERES (rojo), fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por SCLIM tras 20 minutos de la liberación del bloqueo. Las imágenes representan semiesferas de células en 3D. **(A)** La proteína anclada a GPI forma *clusters* en zonas discretas mientras la proteína TM se distribuye de forma homogénea por toda la membrana del RE. **(B)** La gráfica muestra la intensidad de cada cargo a lo largo de la flecha representada en la imagen. Los *clusters* de GPI no co-localizan con el cargo TM. **(C)** Los *clusters* de GPI se encuentran asociados a ERES específicos. Escala 0,5 µm. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

Una vez descritos los procesos de *clustering* y *sorting* en ERES específicos de Gas1-GFP, se abordó el hipotético papel de la ceramida de cadena muy larga C26 en dichos procesos. Con ese objetivo se utilizó una cepa modificada genéticamente en la cual se habían sustituido las ceramidas sintetasas endógenas de levadura (Lag1 y Lac1), las cuales sintetizan ceramida C26, por la ceramida sintetasa del algodón GhLag1 que en la

planta del algodón sintetiza ceramidas de cadena más cortas C18 y C16. Mediante espectrometría de masas se comprobó que las membranas celulares de la cepa mutante de levadura *GhLag1* contienen mayoritariamente ceramidas más cortas C18 y C16 en lugar de la ceramida C26 sintetizada en la cepa silvestre. Sin embargo, el análisis de la ceramida presente en el GPI de la proteína Gas1-GFP expresada en este mutante *GhLag1* indicó que esta ceramida seguía teniendo 26 carbonos como en la cepa silvestre. El hecho de que en la cepa *GhLag1* solo se reduzca la longitud de las ceramidas libres de membrana, pero no de las que constituyen el GPI, permitió usar esta cepa para evaluar específicamente la relevancia de las ceramidas C26 libres de membrana en los procesos de *clustering* y *sorting* de Gas1-GFP en el RE.

El análisis mediante microscopía SCLIM de la distribución de Gas1-GFP y Mid2-iRFP en el mutante *GhLag1* reveló que Gas1-GFP no es capaz de formar *clusters*, localizándose en su lugar de forma dispersa y homogénea por toda la membrana del RE al igual que la proteína transmembrana Mid2-iRFP. Además, se observó que en este mutante la mayoría de ERES (70%), contenía ambos cargos co-localizando dentro de ellos. Por tanto, estos datos demuestran que las ceramidas de cadena muy larga C26 presentes en las membranas del RE son necesarias para la formación de *clusters* de Gas1-GFP y su posterior *sorting* en ERES específicos (Figura 18).

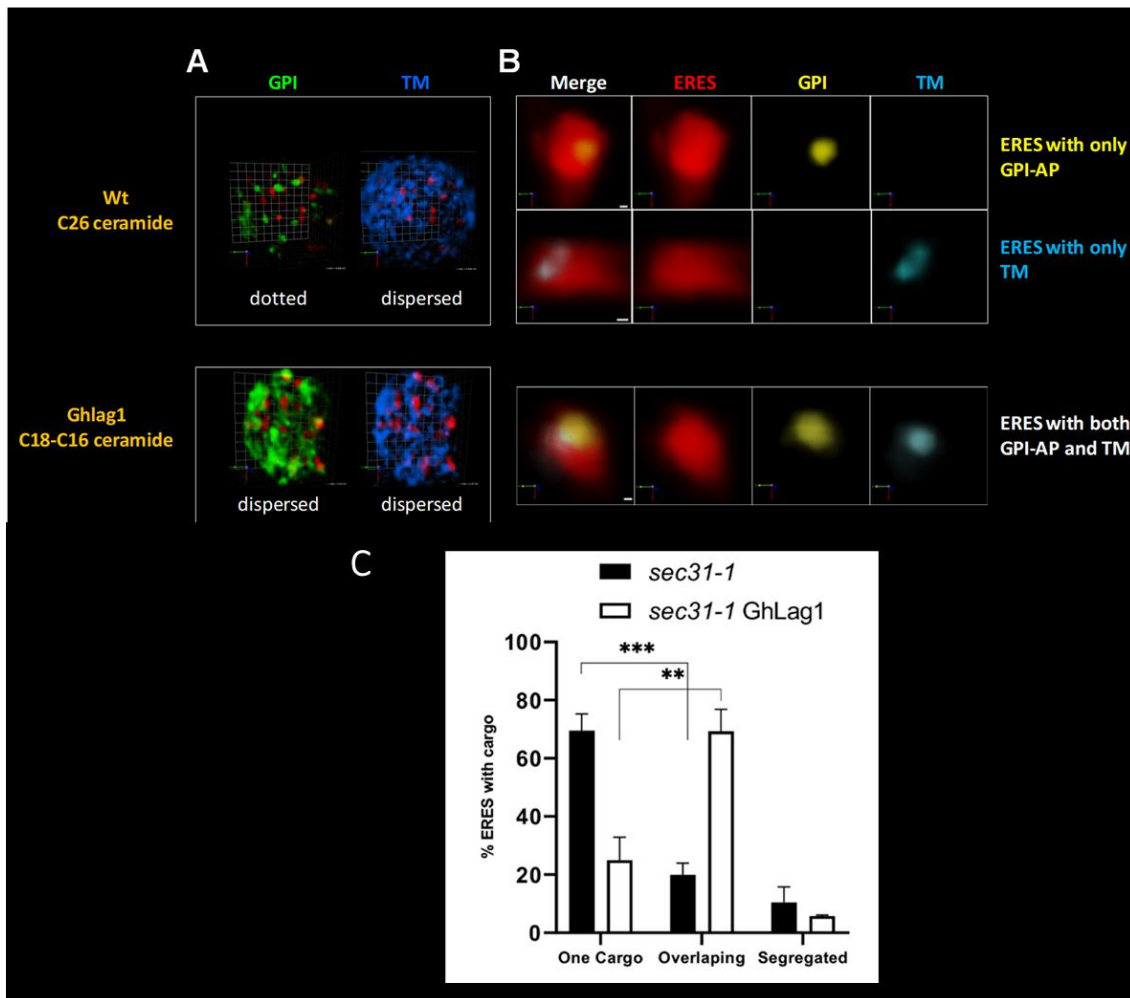


Figura 18. El *clustering* y *sorting* de las proteínas ancladas a GPI depende de la longitud de las ceramidas libres presentes en la membrana del RE

Las cepas *sec31-1* y *sec31-1 GhLag1* que expresaban Gas1-GFP (verde) y Mid2-iRFP (azul) bajo un promotor inducible de galactosa, y Sec13-mCherry de forma constitutiva como marcador de ERES (rojo), se visualizaron tal y como se describe en la Figura 17. **(A)** Las imágenes representan semiesferas de células 3D donde aparecen los dos tipos de cargos y los ERES. La disminución en la longitud de la ceramida de la membrana del RE provoca la eliminación de los *clusters* de GPI, el cual presenta una distribución homogénea al igual que el cargo TM. Escala 0,45µm. **(B)** Se muestran ejemplos de ERES extraídos de A conteniendo ambos cargos por separado en el caso de *sec31-1* o ambos cargos mezclados para el caso de *sec31-1 GhLag1*. Escala 100nm. **(C)** El grafico muestra el porcentaje medio de ERES que contienen un único cargo, los dos cargos mezclados y los cargos segregados dentro del mismo ERES. n = 432 en 54 células (*sec31-1*) y 430 en 47 células (*sec31-1 GhLag1*) de tres réplicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD (*Standar Deviation*). Estadístico: T test no pareado de dos colas. ***p < 0,001 y **p < 0,01. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

Posteriormente, se observó utilizando microscopía de fluorescencia convencional que la formación de *clusters* de Gas1-GFP no solo requiere de lípidos de membrana específicos como las ceramidas C26, sino que también depende de las proteínas transmembrana p24 (Figura 19). Como se describe en la sección de introducción, estas proteínas forman un complejo heteromérico que actúa como receptor de transporte capturando selectivamente a las proteínas ancladas a GPI en el lumen del RE y conectándolas en el citosol con la subunidad COPII especializada Lst1 para exportarlas en vesículas COPII (Figura 10). Puesto que se pudo determinar que la cubierta COPII especializada (Lst1) no interviene en la formación de *clusters* de Gas1-GFP, se exploró la posibilidad de que este proceso dependiera directamente de la interacción del receptor p24 con las ceramidas C26 en la membrana del RE (Figura 19).

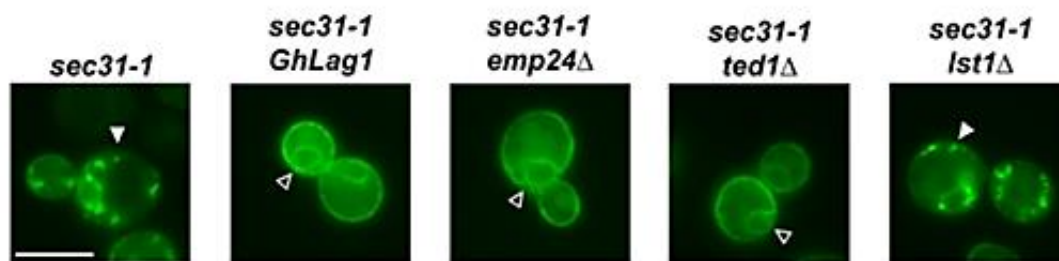


Figura 19. El *clustering* de Gas1-GFP depende de su interacción con el receptor p24

Las cepas *sec31-1*, *sec31-1 GhLag1*, *sec31-1 emp24Δ*, *sec31-1 ted1Δ* y *sec31-1 lst1Δ* que expresaban Gas1-GFP bajo un promotor inducible de galactosa, fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por microscopía de fluorescencia convencional tras 20 minutos. Flechas blancas: *clusters* de Gas1-GFP. Flechas vacías: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μm. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

Utilizando la técnica de simulación computacional denominada dinámica molecular se encontró que las ceramidas C26 libres de membrana se acumulan en la hemicapa citosólica alrededor del dominio transmembrana de Emp24, siendo excluidas de la hemicapa luminal (Figura 20). Esto sugiere que el dominio transmembrana de Emp24 puede promover localmente una distribución asimétrica de los lípidos de una bicapa. Sin embargo, las ceramidas más cortas C18 mostraron la misma afinidad que las ceramidas de cadena muy larga C26 por la parte citosólica del dominio transmembrana de Emp24,

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

sugiriendo que el mecanismo de segregación de las proteínas ancladas a GPI tiene que depender específicamente de las propiedades biofísicas únicas que presentan las ceramidas de cadena muy larga C26. De hecho, estudios previos realizados en sistemas de membrana artificiales mostraron que las ceramidas de cadena muy larga promueven la separación de fases y la curvatura de la membrana (Pinto et al., 2011), y que estos fenómenos biofísicos se deben a la capacidad de las ceramidas muy largas de interdigitarse parcialmente entre sí, formando fases en la membrana con un mayor grosor (Ventura et al., 2020). Por tanto, en base a las evidencias disponibles se propuso un modelo para explicar el papel de las ceramidas C26 y el receptor p24 en la segregación y exportación diferencial de proteínas ancladas a GPI con ceramida C26 desde el RE. Según este modelo, el receptor p24 estaría favoreciendo la formación de una fase interdigitada al concentrar ceramida C26 libre en la parte citosólica de la membrana y proteínas ancladas a GPI con ceramida C26 en la parte luminal. Esta interdigitación local induciría el *clustering* y la curvatura de la membrana del RE, dando lugar a la segregación e incorporación de las proteínas ancladas a GPI en ERES específicos (Figura 21). En la presente tesis nos propusimos evaluar las predicciones más relevantes de este modelo como son el requerimiento de la ceramida C26 presente en el GPI, así como el papel jugado por el receptor p24 en la organización de la ceramida en la membrana del RE.

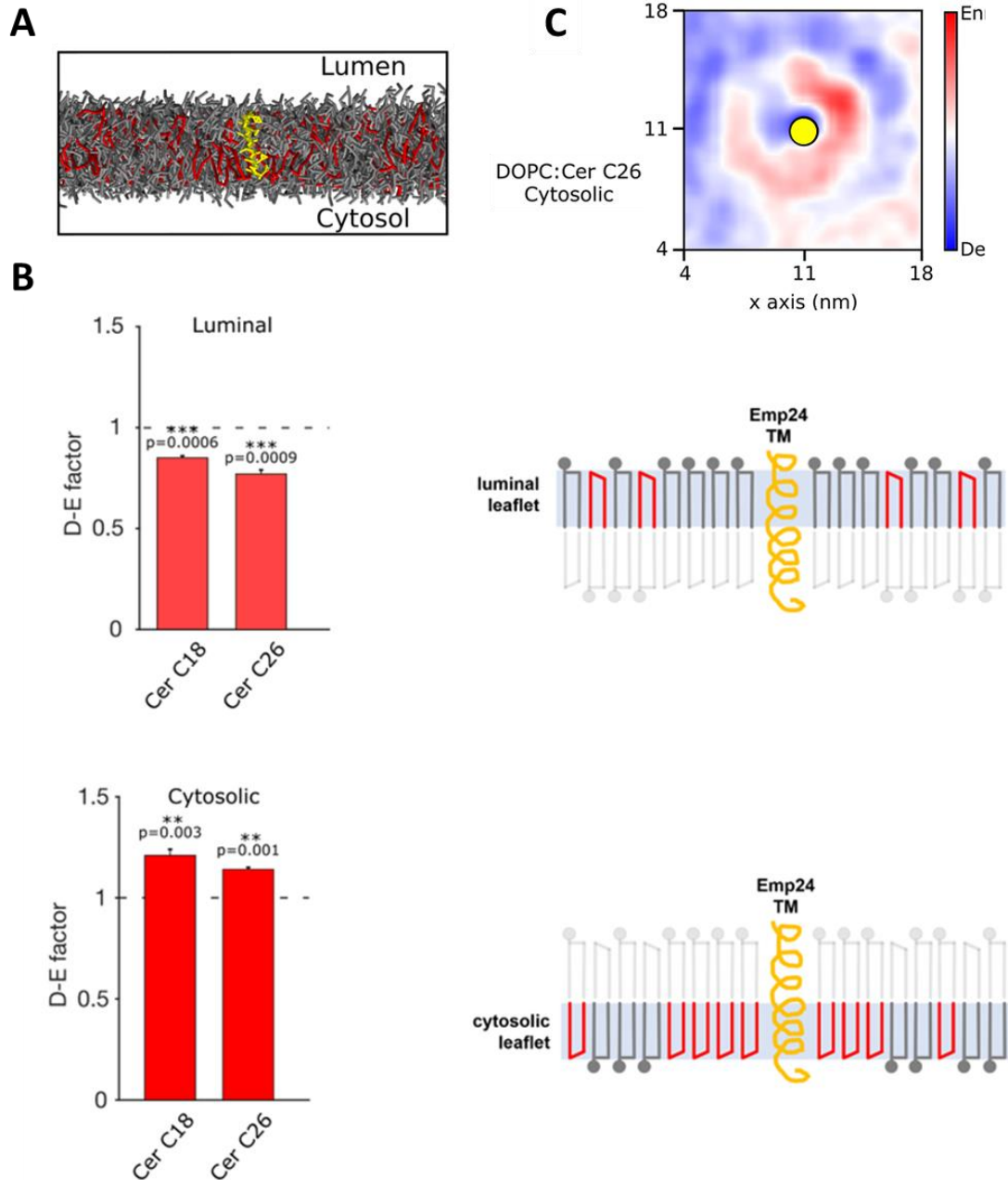


Figura 20. La ceramida se encuentra enriquecida alrededor de la porción citosólica del tallo transmembrana de Emp24

(A) Imagen lateral de la bicapa lipídica conteniendo DOPC (gris) y ceramida (rojo) con el tallo transmembrana de Emp24 en amarillo. (B) Análisis cuantitativo de la distribución de ceramida C18 (cer C18) o C26 (cer C26) alrededor del tallo transmembrana de Emp24 en el lado luminal (gráfico superior) o citosólico (gráfico inferior). Los gráficos representan el factor de Depleción-Enriquecimiento (D-E factor) que indica la depleción de ceramida para valores por debajo de 1 o el enriquecimiento para valores superiores a 1. El análisis D-E mostró que tanto la ceramida C18 como la C26 eran depletadas alrededor de la porción luminal de Emp24 mientras se enriquecía en la porción citosólica. Los dibujos representan el análisis D-E (DOPC en gris, ceramida en rojo). (C) Vista superior de un mapa D-E para ceramida de C26 alrededor del tallo transmembrana de EMP24 (círculo amarillo) en la parte citosólica de una bicapa formada por DOPC:ceramida. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

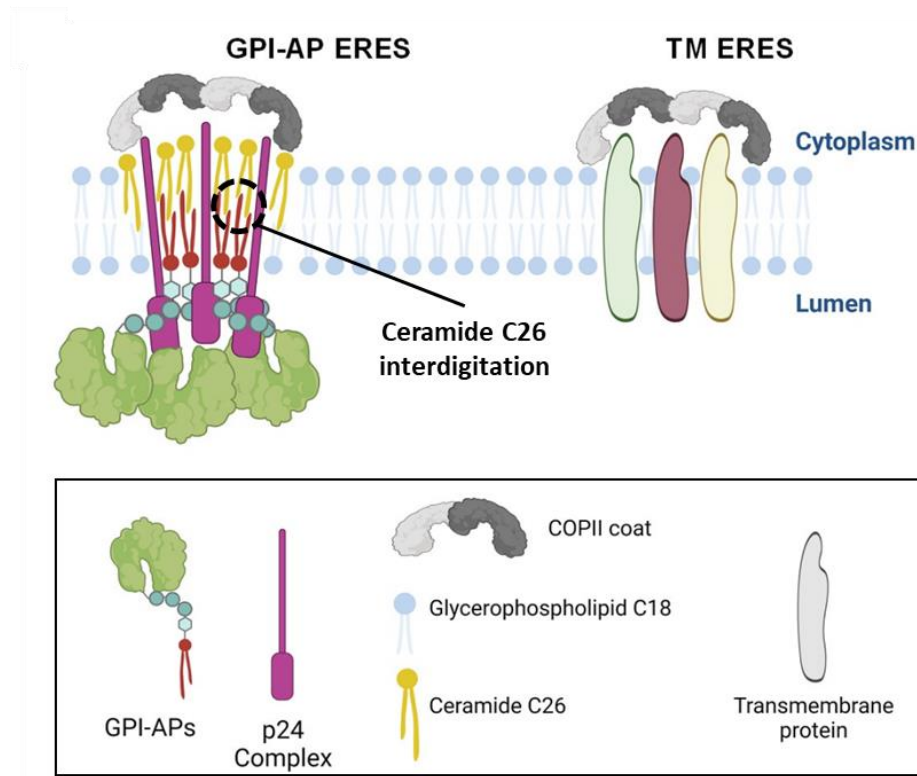


Figura 21. Modelo: *Clustering* y *sorting* de las proteínas ancladas a GPI dependiente de las ceramidas muy largas C26

El receptor p24 concentraría localmente a las ceramidas libres C26 en la hemicapa citosólica de la membrana, mientras que uniría a las proteínas ancladas a GPI con ceramida C26 en la región luminal. La presencia de ceramida C26 a ambos lados de la bicapa lipídica generaría fases interdigitadas, lo cual promovería la curvatura de la membrana y el *clustering* de las proteínas ancladas a GPI junto con la ceramida libre C26 en zonas concretas de la membrana, donde el resto de proteínas transmembrana quedarían excluidas. Finalmente, esto conduciría al *sorting* de las proteínas ancladas a GPI en ERES específicos y su posterior incorporación en vesículas COPII especializadas. Figura adaptada de (Aguilera-Romero & Muñiz, 2021).

OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares que dirigen el proceso de segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI desde el RE mediado por ceramidas de cadena muy larga utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo celular. Con ello pretendemos entender mejor el papel de los lípidos de membrana en el *sorting* de las proteínas de secreción en la ruta secretora.

Para abordar el objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar el posible papel de la ceramida de cadena muy larga de 26 carbonos presente en la estructura del GPI en la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI a través de ERES específicos.
2. Determinar la implicación del receptor p24 en el mecanismo de segregación y exportación selectiva de proteínas ancladas a GPI a través de ERES específicos mediado por ceramidas C26 de membrana.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

3. RESULTADOS

RESULTADOS

3.1. Análisis del papel de la ceramida presente en la estructura del GPI en la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI a través de ERES específicos

Dados nuestros resultados previos en los que se demuestra que las ceramidas libres de cadena muy larga C26 presentes en la membrana del RE están implicadas en la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI (Rodríguez-Gallardo et al., 2020), el objetivo de este primer capítulo fue analizar si también las ceramidas C26 que forman parte de la propia estructura del GPI intervienen en dicho proceso. Con ello pretendemos testar nuestra hipótesis de partida según la cual ambos tipos de ceramidas interdigitarían entre sí formando un microdominio lipídico que induciría el *clustering* y *sorting* de las proteínas ancladas a GPI en ERES específicos.

3.1.1. La ceramida C26 incorporada al GPI por Cwh43 es necesaria para el *clustering* de Gas1 y su posterior exportación del RE

Para determinar el posible papel de la ceramida C26 que forma parte de la estructura del GPI en la exportación selectiva de estas proteínas utilizamos la proteína anclada a GPI Gas1, la cual se ha demostrado que incorpora ceramida C26 tras la remodelación de la porción lipídica llevada a cabo en el RE por la enzima Cwh43 (Rodríguez-Gallardo et al., 2020; Yoko-O et al., 2013). Estudios previos indicaban que la delección del gen *CWH43* produce la acumulación de Gas1 en el RE (Yoko-O et al., 2013; Yoko-O et al., 2018). Estos resultados fueron confirmados por *Western Blot*, donde se pudo observar que el mutante nulo *cwh43Δ* acumula la forma inmadura de RE de Gas1 al igual que el mutante nulo *bst1Δ* (Figura 22A), siendo Bst1 la enzima que inicia la remodelación del GPI deacilando al inositol (Figura 13). Este defecto de *cwh43Δ* en el transporte RE-Golgi es específico para Gas1 ya que la maduración en el Golgi de la proteína soluble Carboxipeptidasa Y (CPY) no se vio afectada (Figura 22A). Finalmente, comprobamos mediante microscopía de fluorescencia que el mutante *cwh43Δ*, al igual que *bst1Δ*, acumula Gas1-GFP en el RE, lo cual se evidencia por la detección de Gas1-GFP en el anillo

RESULTADOS

perinuclear característico del RE de las células de levadura (Figura 22B). Por tanto, estos resultados confirman que la adquisición de ceramida C26 por parte del GPI de Gas1 es necesaria para su correcta exportación del RE.

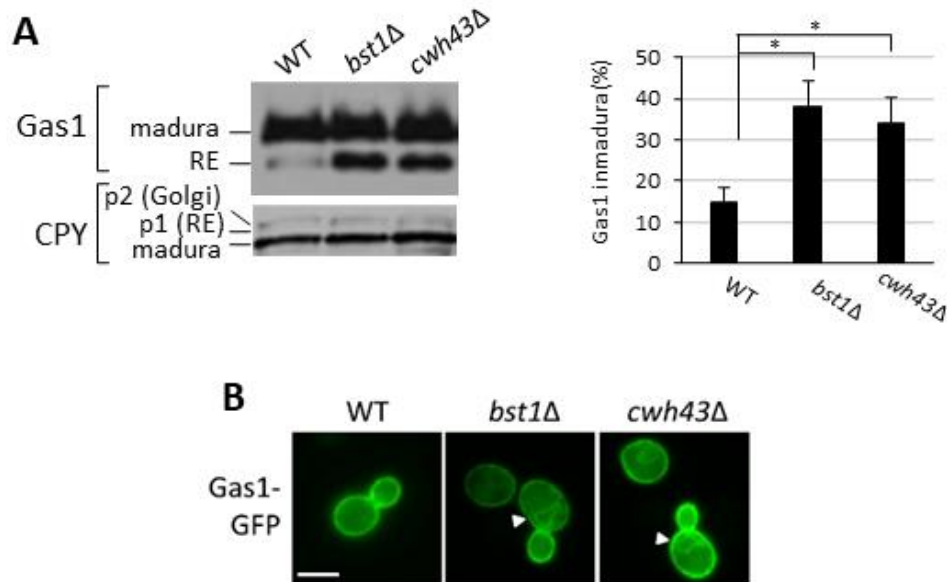


Figura 22. La delección de *CWH43* causa acumulación de la forma de RE de Gas1

(A) Los extractos de las cepas silvestre y mutantes fueron analizados por *western blot* para Gas1 y CPY. Madura, forma madura de Gas1 y CPY; ER, forma inmadura de Gas1; p1 y p2, forma de Re y Golgi de CPY respectivamente. Se muestra la cuantificación del porcentaje de Gas1 inmadura. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Test T de *student*, * $p < 0,05$. **(B)** Localización de Gas1-GFP analizada por microscopía de fluorescencia convencional en las cepas silvestre y mutantes previamente comentados. Flechas blancas: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μ m. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

Nuestros estudios previos muestran que la proteína Gas1-GFP recién sintetizada, se concentra lateralmente en la membrana del RE formando *clusters* que están íntimamente asociados a ERES específicos (Rodríguez-Gallardo et al., 2020). Dado que la formación de estos *clusters* requiere de la presencia de la ceramida libre C26 en la membrana del RE, quisimos conocer si también la ceramida C26 del GPI participa en dicho proceso. Para ello, utilizamos el sistema genético optimizado en nuestro laboratorio que permite observar por microscopía de fluorescencia la presencia de *clusters* de proteínas ancladas a GPI. Como se ha explicado anteriormente, este sistema

consiste en inducir primero la expresión de Gas1-GFP bajo el control del promotor de galactosa en el mutante termosensible *sec31-1*, el cual a temperatura restrictiva (37°C) no puede formar vesículas COPII, acumulando a la proteína Gas1-GFP recién sintetizada en el RE. Posteriormente, al bajar la temperatura hasta los 24°C, el transporte se restaura, con lo que Gas1-GFP comienza a entrar en ERES específicos para salir del RE. Así, observamos que en la cepa *sec31-1*, Gas1-GFP muestra un patrón punteado formando *clusters*, mientras que en las cepas mutantes *sec31-1 cwh43Δ* y *sec31-1 bst1Δ*, Gas1-GFP se localizó de forma dispersa y homogénea por toda la membrana del RE (Figura 23). Estos datos demuestran que la remodelación o incorporación de ceramida C26 en el GPI por parte de Cwh43 es esencial para la formación de *clusters* de Gas1 en el RE.

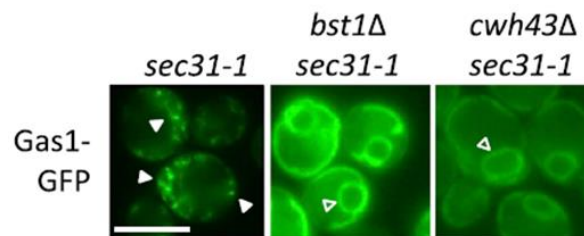


Figura 23. Las cepas mutantes *bst1Δ* y *Cwh43Δ* son defectivas en la formación de *clusters* de Gas1-GFP

Las cepas *sec31-1*, *sec31-1 bst1Δ*, *sec31-1 cwh43Δ*, que expresaban Gas1-GFP bajo un promotor inducible de galactosa, fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por microscopía de fluorescencia convencional tras 20 minutos de la liberación del bloqueo. Flechas blancas: *clusters* de Gas1-GFP. Flechas vacías: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μm. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

Teniendo en cuenta nuestros resultados previos, en los que la alteración de la ceramida libre de membrana afectaba de forma directa a la capacidad de Gas1 de formar *clusters* en el RE (Rodríguez-Gallardo et al., 2020), quisimos comprobar que las ceramidas libres de membrana no se veían alteradas en el mutante *cwh43Δ* y que, por tanto, el efecto observado en este mutante era causado directamente por la carencia de ceramida por parte del GPI. Para ello se analizó en la cepa mutante *cwh43Δ* la biosíntesis de los esfingolípidos complejos, los cuales se sintetizan en el Golgi a partir de ceramida libre transportada desde el RE. El análisis realizado mediante TLC (*Thin Layer*

RESULTADOS

Chromatography) mostró que los esfingolípidos complejos son sintetizados de forma normal en el mutante *cwh43Δ*, lo que implica que la ceramida se sintetiza en el RE y se transporta correctamente al Golgi en dicho mutante (Figura 24). Estos resultados apoyan la idea de que la adquisición de ceramida C26 por parte del GPI contribuye directamente a la formación de *clusters* de Gas1 en el RE.

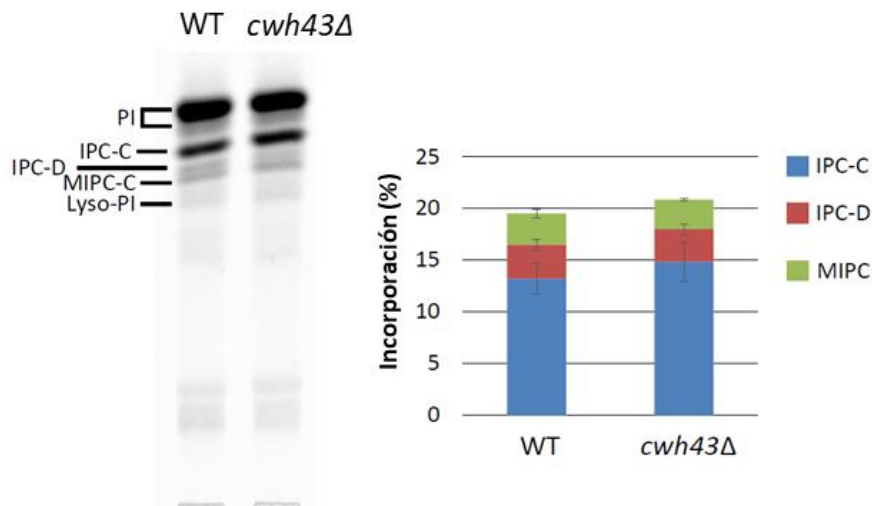


Figura 24. Los esfingolípidos complejos son sintetizados de forma normal en el mutante *cwh43Δ*

Las células fueron crecidas a 25 °C, cambiadas a 30 °C durante 20 minutos y marcadas con [3 H]myo-inositol durante 2 horas. Los lípidos marcados fueron sometidos a TLC con un solvente Cloroformo-metanol-0,25% KCl (55:45:10 vol/vol/vol) y visualizados en un sistema FLA-7000. La incorporación (%) de [3 H]myo-inositol en IPC-C, IPC-D y MIPC fue cuantificada. Los datos representan la media y la SD de tres réplicas biológicas independientes. PI: fosfatidilinositol; IPC: inositolfosfoceramida; MIPC: manosil-inositol-fosfoceramida; C y D: estado de hidroxilación. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

3.1.2. Ted1 monitoriza la incorporación de ceramida C26 en el GPI de Gas1 para garantizar su exportación del RE

Nuestros estudios previos habían demostrado que tanto la exportación de Gas1 del RE, como su capacidad para formar *clusters*, dependen de su reconocimiento e interacción con el receptor transmembrana p24, quien se encarga de conectar a las proteínas ancladas a GPI con la cubierta proteica COPII para incorporarlas en las vesículas COPII nacientes (Manzano-Lopez et al., 2015; Rodríguez-Gallardo et al., 2020). De esta

manera, nos preguntamos, si los defectos de exportación del RE y formación de *clusters* de Gas1 observados en el mutante *cwh43Δ* podrían deberse a la incapacidad del receptor p24 de reconocer específicamente a Gas1 cuando esta carece de ceramida C26 en su GPI. El receptor p24 reconoce e interacciona con Gas1 solo después de que la enzima fosfodiesterasa Ted1 haya eliminado a la etanolaminafosfato (EtNP) presente en la segunda manosa (2^a-EtNP) del glicano del GPI. Por tanto, es posible que en el mutante *cwh43Δ* Ted1 no pudiera remodelar el glicano de Gas1, lo que a su vez impediría la unión del receptor p24, provocando finalmente que Gas1 no forme *clusters* ni salga del RE eficientemente.

Para analizar esta posibilidad, se examinó la interacción entre Gas1-GFP y el componente del complejo p24, Emp24, mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación *in vivo* (Figura 25). Se usó como control negativo el mutante nulo *ted1Δ*, en el cual el complejo p24 es incapaz de unir a las proteínas ancladas a GPI ya que la 2^a-EtNP no es eliminada del GPI (Manzano-Lopez et al., 2015). Como se observa en la Figura 25, mientras que la cepa silvestre mostró una clara asociación entre Emp24 y Gas1-GFP, Emp24 fue incapaz de co-inmunoprecipitar con Gas1-GFP en el mutante *cwh43Δ*, al igual que ocurrió en el mutante *ted1Δ*. Estos datos sugieren que la incorporación de la ceramida C26 en el GPI es necesaria para el reconocimiento de Gas1 por parte del receptor p24.

Es más, este defecto de unión entre Gas1 y su receptor p24 observado en el mutante *cwh43Δ* fue rescatado por la delección adicional del gen *GPI7* (Figura 25). El gen *GPI7* codifica para la enzima que añade la 2^a-EtNP del GPI durante la síntesis del precursor de este, la cual es eliminada posteriormente por la enzima Ted1. La pérdida de función de Gpi7 lleva a la producción de un GPI que no posee la 2^a-EtNP y a la generación de proteínas ancladas a GPI con diacilglicerol (DAG) C26 en lugar de ceramida C26 (Benachour et al., 1999; Fujita, Umemura, et al., 2006; Umemura et al., 2007). Por tanto, el hecho de que la mutación *gpi7Δ* rescate el defecto de interacción de Gas1 con el receptor p24 del mutante *cwh43Δ* sugiere que este defecto podría deberse a la incapacidad de Ted1 para eliminar la 2^a-EtNP del glicano del GPI.

RESULTADOS

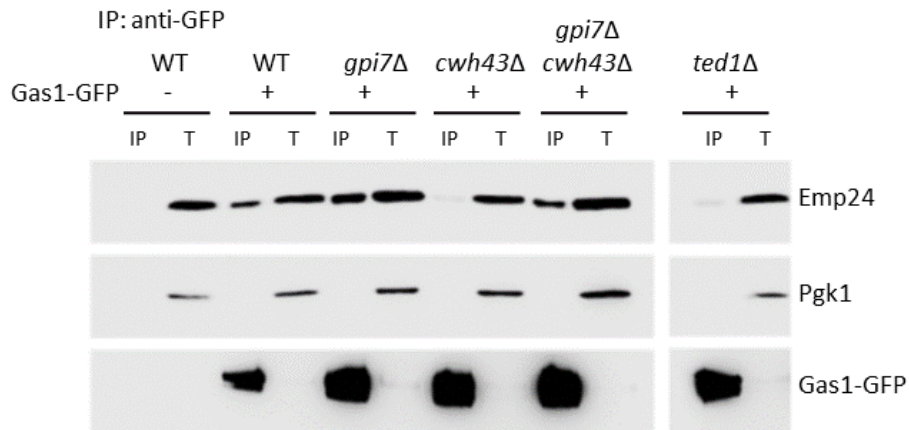


Figura 25. La mutación *gpi7Δ* suprime el defecto de interacción entre Gas1-GFP y el complejo p24 causado por la delección de *CWH43*

Ensayo de co-inmunoprecipitación entre Gas1-GFP y la subunidad del complejo p24, Emp24. Fracciones enriquecidas de RE de la cepa silvestre y las cepas mutantes que expresaban Gas1-GFP fueron procesadas y sometidas a inmunoprecipitación nativa. La interacción fue específica dado que la proteína citosólica Pdk1 no se encontraba asociada a Gas1-GFP tras la inmunoprecipitación. El material inmunoprecipitado (IP) fue resuelto por SDS-PAGE y analizado por inmunoblotting con anticuerpos contra Emp24, Pdk1 y GFP. Los totales (T) representan una fracción de las muestras previas a la inmunoprecipitación. Figura extraída de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

Dado que la mutación *gpi7Δ* permite que el receptor p24 pueda reconocer a Gas1 de forma independiente de Ted1, en consecuencia, *gpi7Δ* también debería recuperar la capacidad del receptor p24 de exportar Gas1 del RE en el mutante *cwh43Δ*. En efecto, como se muestra en la Figura 26, la mutación *gpi7Δ* suprimió específicamente la acumulación de Gas1 en el RE causada por *cwh43Δ*. Por contra, la mutación *gpi7Δ* no pudo recuperar el defecto de transporte de Gas1 causado por la eliminación de la subunidad del complejo p24 Emp24 (Figura 27), lo que confirma que la ausencia de la 2^a-EtNP debido a la delección del gen *GPI7* permite al receptor p24 exportar a Gas1 del RE independientemente de Ted1. Por tanto, todos estos resultados sugieren colectivamente que Ted1 no elimina la EtNP hasta que Cwh43 haya incorporado la ceramida C26 en el GPI de Gas1, garantizando así que el receptor p24 solo exporte del RE Gas1 con ceramida C26.

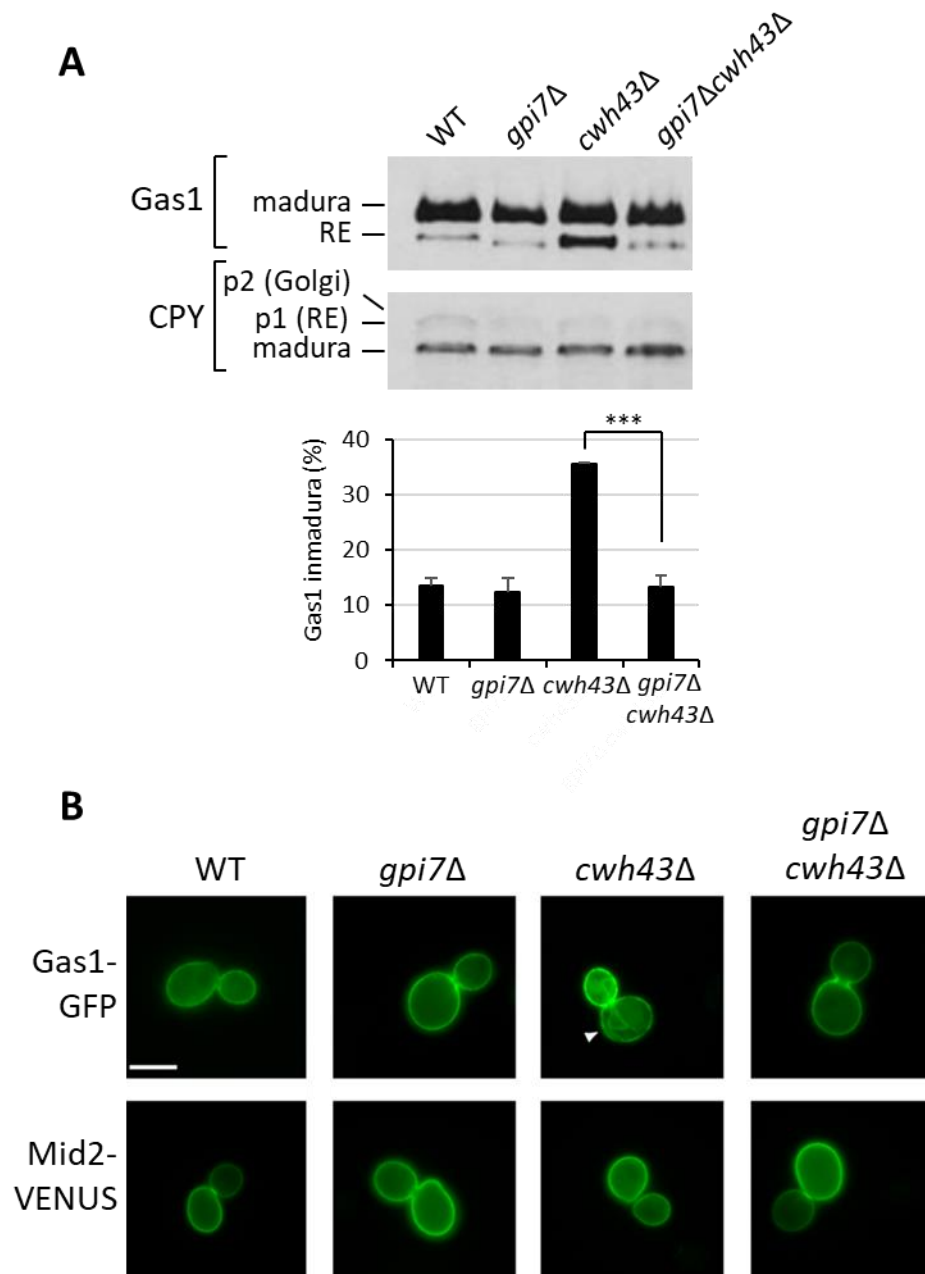


Figura 26. La mutación *gpi7Δ* suprime la acumulación de la forma de RE de Gas1 causada por *cwh43Δ*

(A) Los extractos obtenidos de las cepas silvestre y mutantes fueron analizados por *western blot* para las proteínas CPY y Gas1-GFP. Madura, forma madura de Gas1 y CPY; ER, forma inmadura de Gas1; p1 y p2, forma de RE y Golgi de CPY respectivamente. Se muestra la cuantificación del porcentaje de Gas1 inmadura. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Test T de *student*, *** $p < 0,001$. **(B)** Localización de Gas1-GFP y Mid2-VENUS analizada por microscopía de fluorescencia convencional. El efecto observado sobre la Gas1-GFP fue específico, dado que la proteína transmembrana Mid2-VENUS no se vio afectada. Flechas blancas: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μ m. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

RESULTADOS

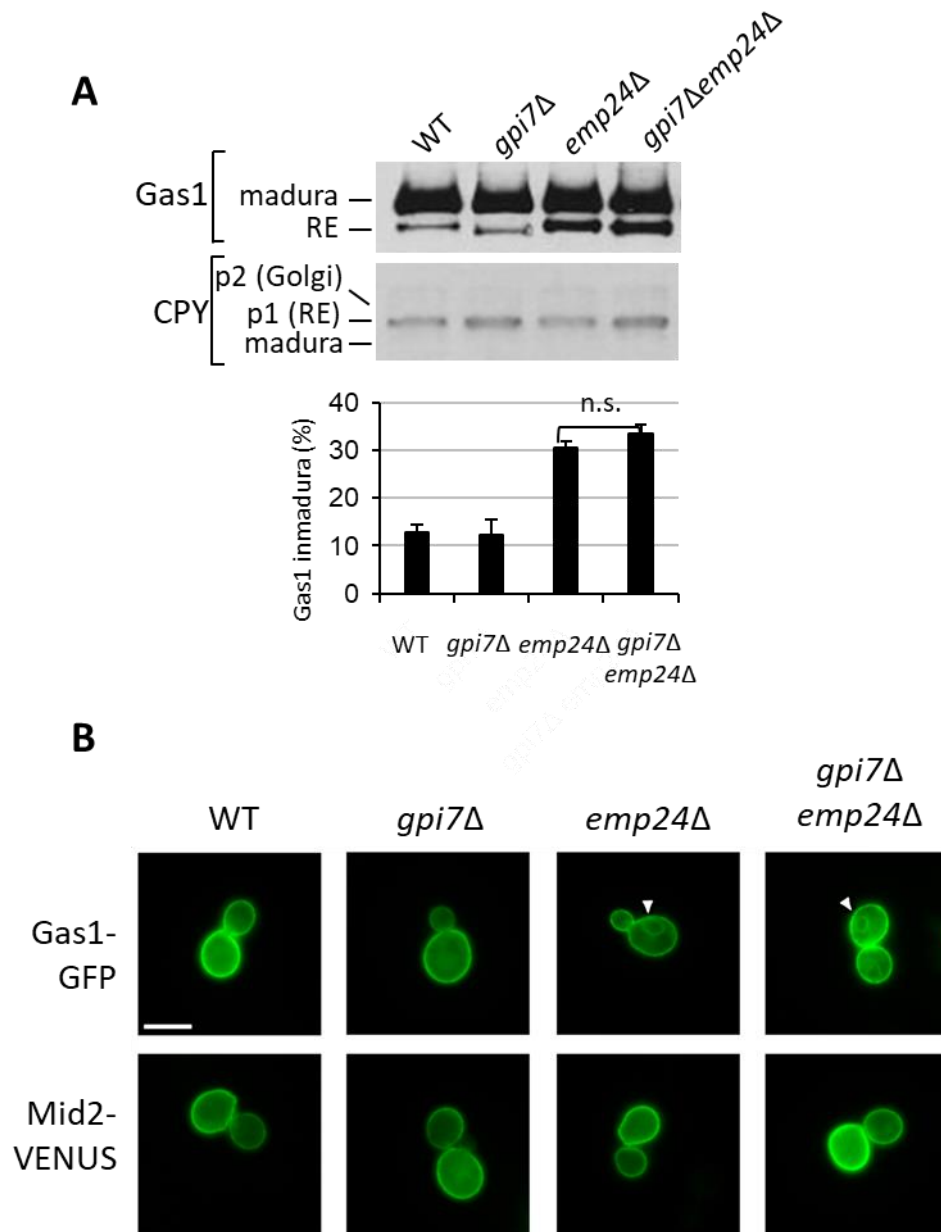


Figura 27. La mutación *gpi7Δ* es incapaz de restaurar el defecto de exportación de Gas1 causado por *emp24Δ*

(A) Los extractos obtenidos de las cepas silvestre y mutantes fueron analizados por *western blot* para las proteínas CPY y Gas1-GFP. Madura, forma madura de Gas1 y CPY; ER, forma inmadura de Gas1; p1 y p2, forma de Re y Golgi de CPY respectivamente. Se muestra la cuantificación del porcentaje de Gas1 inmadura. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Test T de student, n.s., no significativo.

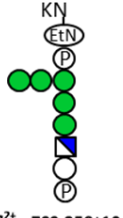
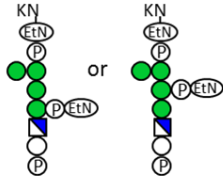
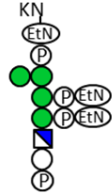
(B) Localización de Gas1-GFP y Mid2-VENUS analizada por microscopía de fluorescencia convencional. El efecto observado sobre la Gas1-GFP fue específico, dado que la proteína transmembrana Mid2-VENUS no se vio afectada. Flechas blancas: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μ m. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

Para confirmar la posibilidad de que Ted1 remodela el glicano del GPI de Gas1 solo si Cwh43 ha incorporado previamente la ceramida C26 en el GPI, se procedió a analizar por espectrometría de masas la composición de dicho glicano en el mutante *cwh43Δ* y así determinar si la 2^a-EtNP está presente en el mismo (Figura 28A). El glicano del precursor del GPI sintetizado inicialmente en la membrana del RE presenta dos EtNP laterales, una EtNP unida a la primera manosa (1^a-EtNP) y la otra EtNP unida a la segunda manosa (2^a-EtNP). Tras la unión de la proteína al GPI, ambas EtNP son eliminadas secuencialmente por enzimas fosfodiesterasas diferentes durante el proceso de remodelación del glicano. En primer lugar, la 2^a-EtNP es eliminada en el RE por Ted1 (Fujita et al., 2009). Posteriormente, ya en el Golgi, la 1^a-EtNP es eliminada por Cdc1 (Vazquez et al., 2014; Yang & Banfield, 2020) (Figura 28B).

En consecuencia, comprobamos por espectroscopía de masas que en la cepa silvestre el glicano del GPI en su forma madura no posee ninguna EtNP, lo que indica que dicho glicano ha sido correctamente remodelado, primero por Ted1 en el RE y después por Cdc1 en el Golgi respectivamente (Figura 28). Para validar esta aproximación experimental, analizamos en el mutante *emp24Δ* el glicano del GPI de la forma inmadura de Gas1-GFP acumulada en el RE, detectándose una sola EtNP en el mismo, que precisamente resultó ser la 1^a-EtNP ya que esta seguía estando presente en el doble mutante *gpi7Δemp24Δ* (Figura 28). La ausencia de la 2^a-EtNP confirma que Ted1 actúa antes de que el receptor p24 exporte a Gas1 del RE mientras que la presencia de la 1^a-EtNP se debe a que Cdc1 actúa en el Golgi. Por el contrario, en la cepa mutante *ted1Δ*, la forma inmadura de Gas1-GFP acumulada en el RE presenta un GPI con ambas EtNP. La 2^a-EtNP no se elimina debido a la delección de *TED1*, mientras que la 1^a-EtNP permanece presente ya que Gas1-GFP queda acumulada en el RE siendo inaccesible para Cdc1 localizada en el Golgi. Finalmente, el análisis del glicano del GPI de Gas1-GFP expresada en la cepa mutante *Cwh43Δ* determinó la presencia de las dos EtNP, al igual que ocurre en el mutante *ted1Δ*, lo que confirma que en el mutante *cwh43Δ* Ted1 es incapaz de eliminar la 2^a-EtNP de Gas1.

RESULTADOS

A

Estructura del glicano del GPI y sus masas monoisotópicas	Abundancia relativa (%) de las tres estructuras mayoritarias del glicano del GPI en Gas1-GFP analizado por LC-ESI-MS/MS						
	WT	<i>gpi7Δ</i>	<i>cwh43Δ</i>	<i>gpi7Δ</i> <i>cwh43Δ</i>	<i>ted1Δ</i>	<i>emp24Δ</i>	<i>emp24Δ</i> <i>gpi7Δ</i>
 $[M+2H]^{2+} = 799.258 \pm 10$ ppm	92,11	89,14	1,64	88,51	1,85	0	0
 $[M+2H]^{2+} = 779.736 \pm 10$ ppm	2,56	2,29	23,63	0	7,27	75,67	86,99
 $[M+2H]^{2+} = 841.240 \pm 10$ ppm	0	0	68,23	1,26	89,05	8,11	0

KN lisina-asparagine; (EtN) Etanolamina; (P) Fosfato; ● Manosa; ▣ Glucosamina; ○ inositol

B

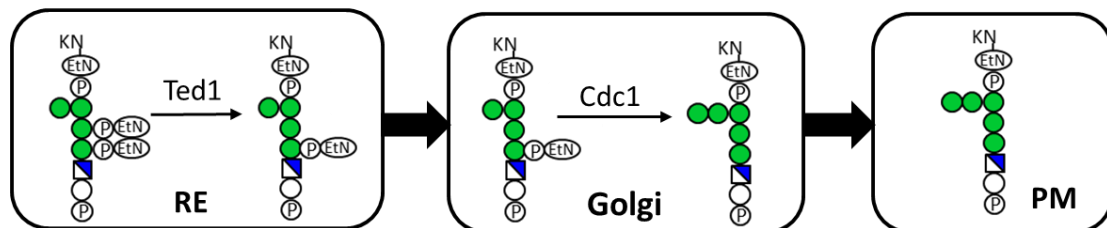


Figura 28. Análisis estructural del glicano del GPI de Gas1-GFP.

(A) Los extractos fueron preparados de células que expresaban Gas1-GFP, las cuales fueron tratadas con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), a continuación, Gas1-GFP fue purificado, digerido con tripsina y analizado por cromatografía líquida y espectrometría de masas con ionización en electrospray (LC-ESI-MS/MS). La tabla muestra los porcentajes de las tres estructuras predominantes del glicano del GPI de Gas1-GFP purificado de las cepas silvestre y mutantes. La abundancia relativa (%) de cada tipo de glicano fue calculada por el pico de intensidad de las masas monoisotópicas de cada estructura. (B) Remodelación del glicano del GPI. En primer lugar, Ted1 elimina la 2^a-EtNP en el RE. Posteriormente, ya en el Golgi, Cdc1 elimina la 1^a-EtNP. Las proteínas ancladas a GPI maduras, en las que ambas EtNP han sido removidas, son transportadas a su destino en la membrana plasmática (PM).

Los resultados anteriores sugieren que la adición de la 2^a-EtNP del glicano del GPI por Gpi7 y su posterior eliminación por Ted1 actúan como un sistema de control de calidad que monitoriza la incorporación de ceramida C26 en el GPI evitando que Gas1 abandone el RE sin la ceramida C26. Este sistema es independiente del control de calidad que monitoriza el plegamiento de la proteína, ya que a pesar de que Gas1 se retenga en el RE en el mutante *cwh43Δ*, su tasa de degradación no se vio afectada, como pudimos determinar mediante un experimento de pulso y caza (Figura 29). Por tanto, Ted1 ejercería un control de calidad sobre el lípido del GPI, que serviría para incrementar la eficiencia del proceso de remodelación del motivo lipídico del GPI con ceramida.

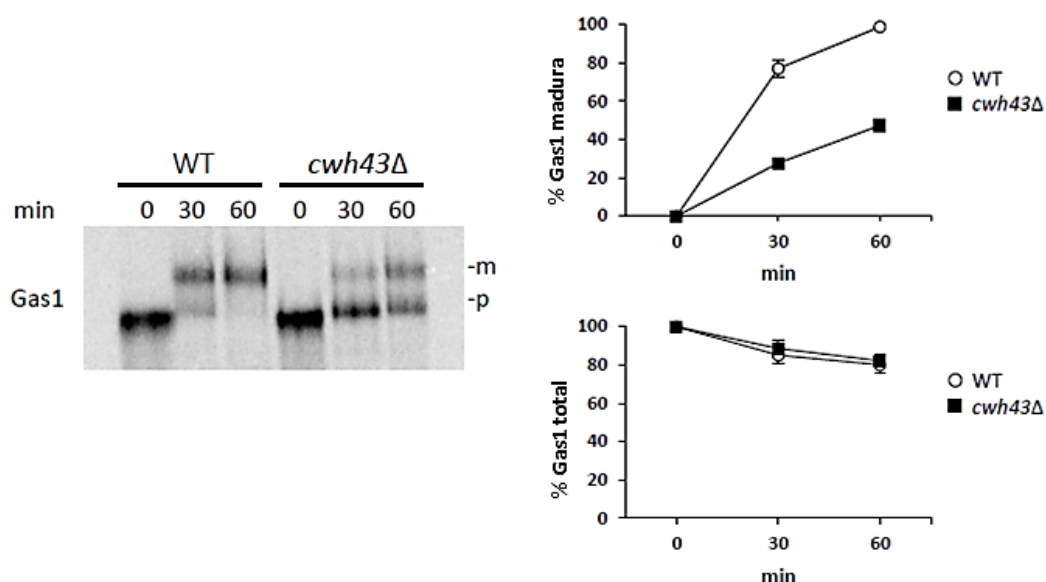


Figura 29. La tasa de degradación de Gas1 no se vio afectada en el mutante *cwh43Δ*

Las células fueron marcadas con [³⁵S]metionina durante 5 minutos a 25 °C y cazadas a los tiempos indicados. Gas1 fue inmunoprecipitada, analizada por SDS-PAGE y visualizada con un phosphoimager. Se cuantificó la cantidad de Gas1 madura y total restante (%) para los distintos tiempos y la media y SD de tres replicas biológicas independientes fueron representadas. m: Gas1 madura; p: Gas1 preprocesada. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

Como se ha comentado anteriormente, hemos demostrado recientemente que la longitud de la ceramida libre presente en las membranas del RE es crucial para la formación de *clusters* y la segregación en el RE de las proteínas ancladas a GPI que contienen ceramida, como es el caso de Gas1 (Rodríguez-Gallardo et al., 2020). Esto

RESULTADOS

concuera con el modelo propuesto, por el cual, las ceramidas libres y las proteínas ancladas a GPI que contienen ceramida serían co-transportadas desde los mismos ERES en las mismas vesículas COPII (Funato et al., 2020; Kajiwara et al., 2008; Loizides-Mangold et al., 2012; Muñiz & Riezman, 2016). Dado que el mutante *gpi7Δ* suprime el defecto de transporte para las proteínas ancladas a GPI que no han remodelado correctamente la porción lipídica, es decir, que no contienen ceramida, nos preguntamos si también haría a este tipo de proteínas independientes de la presencia de ceramida libre para su transporte. Para examinar esta posibilidad hicimos uso de la droga miriocina, un inhibidor específico de la enzima serina-palmitoiltransferasa (SPT), la cual cataliza uno de los primeros pasos de la síntesis de ceramida y, por tanto, de los esfingolípidos (Horvath et al., 1994). Cuando la cepa silvestre fue tratada con miriocina, pudimos observar una mayor acumulación en el RE de Gas1 o Gas1-GFP, pero no de las proteínas no ancladas a GPI, CPY o Mid2-VENUS, sin embargo, el mutante *gpi7Δ* no se vio afectado (Figura 30A y B). Estos resultados indican que la ausencia de la 2^a-EtNP en *gpi7Δ* anula, no solo el control sobre la remodelación lipídica del GPI mediado por Ted1, sino también, el requerimiento de ceramida libre para la exportación de este tipo de proteínas del RE.

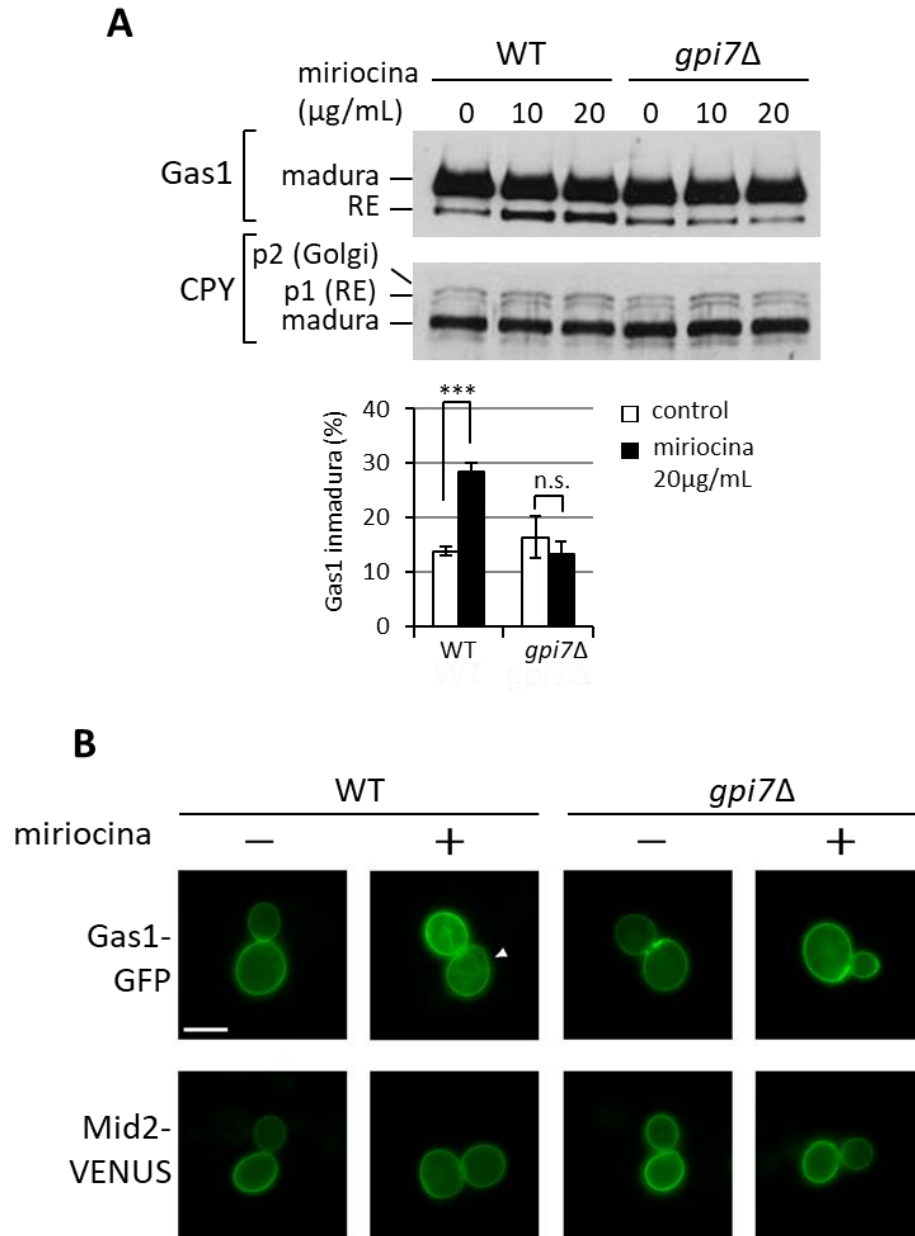


Figura 30. El mutante *gpi7Δ* anula la dependencia de ceramida para el transporte de las proteínas ancladas a GPI

(A) Extractos de células tratadas con las concentraciones de miriocina indicadas fueron analizados por *western blot* para las proteínas Gas1 y CPY. Se determinó el % de Gas1 inmadura (RE). Las barras representan la media de tres réplicas biológicas independientes. Las barras de error indican la SD. Test T de student, n.s., no significativo y *** $p < 0,001$. (B) Localización de Gas1-GFP y Mid2-VENUS en células tratadas o no con miriocina (20 μg/ml, durante 1,5 h a 24 °C). El efecto observado sobre la Gas1-GFP fue específico, dado que la proteína transmembrana Mid2-VENUS no se vio afectada. Flechas blancas: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Barra de escala, 5 μm. Figura adaptada de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

RESULTADOS

3.1.3. La segregación selectiva de Gas1 en ERES específicos depende de la remodelación de ceramida del GPI

Nuestros estudios previos muestran que la proteína anclada a GPI Gas1-GFP sale del RE a través de ERES distintos a los usados por la proteína transmembrana Mid2-iRFP, y que esta segregación, así como su agrupación en *clusters*, se ven afectados por la reducción de la longitud de la ceramida libre presente en la membrana del RE (Rodríguez-Gallardo et al., 2020). Quisimos determinar, por tanto, si también la ceramida presente en el GPI de Gas1 está implicada en estos eventos de segregación y exportación de Gas1 a través de ERES específicos como predice nuestro modelo. Para abordar esta cuestión utilizamos el mutante *gpi7Δ*, que genera Gas1 con DAG en lugar de ceramida (Benachour et al., 1999) y además anula el control ejercido sobre la remodelación lipídica por Ted1, ya que restaura la exportación desde el RE de Gas1-DAG en el mutante *cwh43Δ* (Figura 26). Utilizando el sistema genético basado en el alelo mutante termosensible *sec31-1*, quisimos comprobar si los eventos de *clustering* se veían afectados en las cepas *sec31-1 gpi7Δ* y *sec31-1 gpi7Δcwh43Δ*, las cuales carecen de ceramida en el GPI y, sin embargo, son capaces de ser exportadas eficientemente del RE al saltarse el control de calidad ejercido por la enzima Ted1. Tal y como se observa en la Figura 31, ambas cepas eran defectuosas en la formación de *clusters* en la membrana del RE. Es decir, la agrupación de la proteína anclada a GPI Gas1-GFP en *clusters* específicos cerca de los ERES se encuentra mediada por la presencia de ceramida en el GPI.

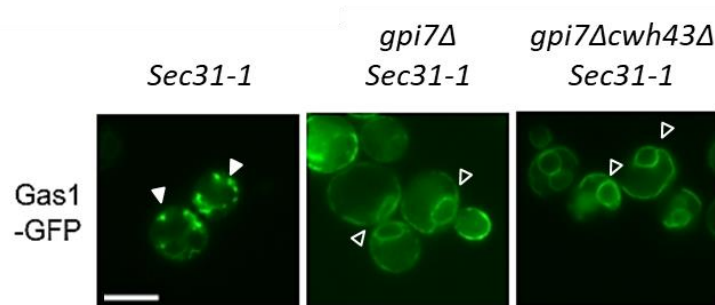


Figura 31. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP que contiene DAG falla en la formación de *clusters* en el RE

Las cepas *sec31-1*, *sec31-1 gpi7Δ* y *sec31-1 gpi7Δcwh43Δ*, que expresaban Gas1-GFP bajo un promotor inducible de galactosa, fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por microscopía de fluorescencia convencional tras 20 minutos de la liberación del bloqueo. Flechas blancas: *clusters* de Gas1-GFP. Flechas vacías: distribución homogénea de Gas1-GFP mostrando la tinción característica del RE perinuclear. Escala 5 μm.

Para analizar la segregación en ERES específicos se llevó a cabo un experimento de microscopía de fluorescencia mediante SCLIM. En este caso, se hizo uso de las cepas *sec31-1*, *sec31-1 gpi7Δ* y *sec31-1 gpi7Δcwh43Δ* que además de expresar Sec13-mCherry, expresaban la proteína anclada a GPI Gas1-GFP y la proteína transmembrana Mid2-iRFP bajo el promotor de galactosa. Tras la incubación de 30 minutos a 37 °C y la consiguiente liberación del sistema a 24 °C se cuantificó la proporción de ERES con la presencia de un solo cargo, Gas1-GFP o Mid2-iRFP, o la presencia de ambos (Figura 32). En los paneles de la parte derecha de la Figura 32 se muestran solo los cargos que co-localizan con Sec13-mCherry, Gas1-GFP en gris y Mid2-iRFP en cian, es decir, la proporción de cada cargo que se encuentra dentro de los ERES, listo para salir en vesículas COPII. En la cepa *sec31-1* la mayoría de ERES, en torno al 75%, contenían un solo tipo de cargo, un 15% contenía ambos cargos que co-localizaban dentro del mismo ERES, mientras un 10% contenía ambos cargos, pero segregados en zonas distintas dentro del mismo ERES. Estos resultados concuerdan con datos previos, en los que Gas1-GFP es segregada en ERES específicos, distintos a los de las transmembranas como Mid2-iRFP, antes de salir del RE. Sin embargo, encontramos que en los mutantes *sec31-1 gpi7Δ* y *sec31-1 gpi7Δcwh43Δ*, ambos carentes de ceramida en el GPI, un alto número de ERES, en torno al 40%, contenían ambos cargos mezclados, mientras que el porcentaje de ERES con un solo cargo se vio reducido (Figura 32). De estos resultados podemos deducir que la ceramida presente en el GPI está implicada en la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI a través de ERES específicos y, además, que este *sorting* mediado por lípidos se hallaría controlado por la remodelación del glicano del GPI realizada por Ted1.

RESULTADOS

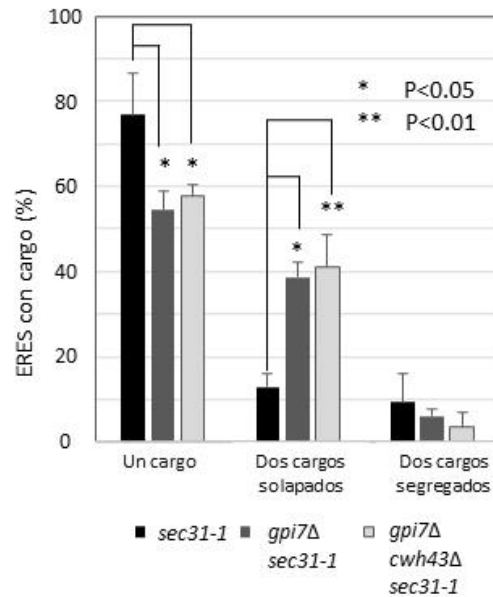
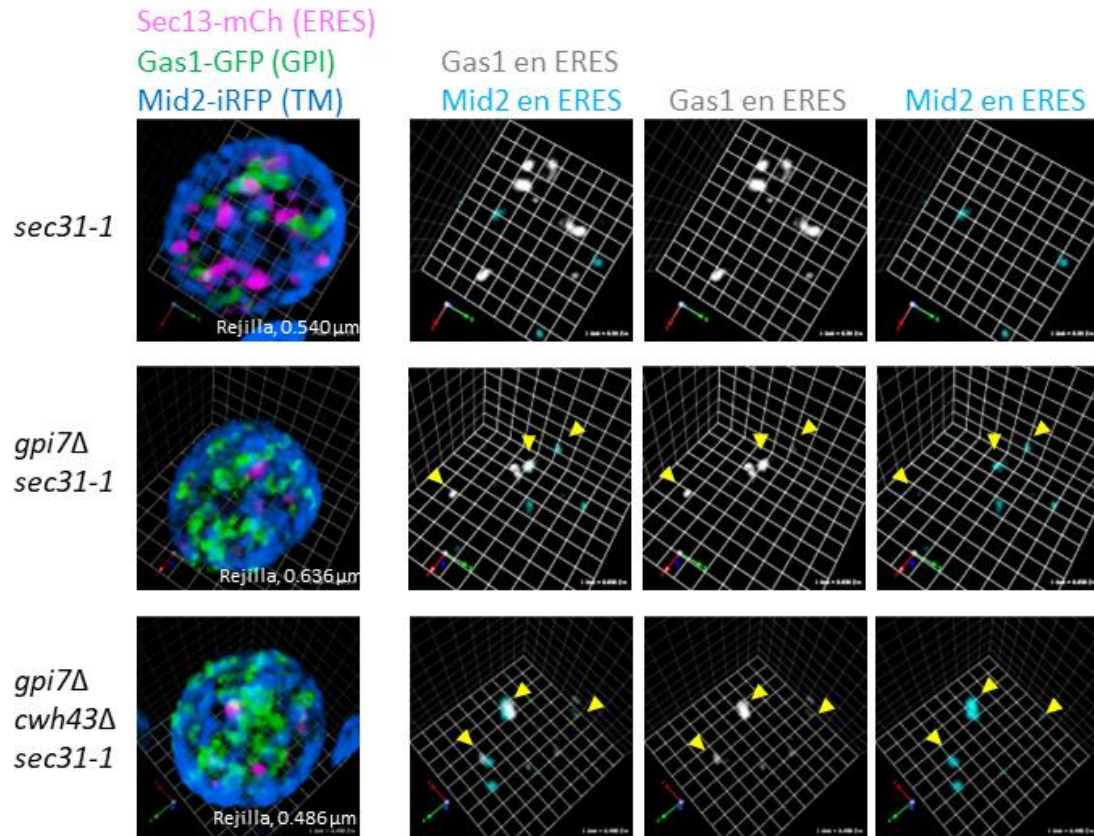


Figura 32. La proteína anclada a GPI Gas1-GFP con DAG entra en los mismos ERES que la proteína transmembrana Mid2-iRFP

Las cepas *sec31-1*, *sec31-1 gpi7 Δ* y *sec31-1 gpi7 Δ cwh43 Δ* , que expresaban Gas1-GFP (verde) y Mid2-iRFP (azul) bajo un promotor inducible de galactosa, y Sec13-mCherry de forma constitutiva como marcador de ERES (magenta), fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por SCLIM tras 20 minutos de la liberación del bloqueo.

Los paneles de la izquierda representan imágenes de semiesferas de células en 3D donde aparecen los dos tipos de cargos y los ERES. Los paneles de la derecha muestran las mismas imágenes, pero procesadas para representar únicamente el cargo que se encuentra dentro de los ERES (Gas1-GFP en gris y Mid2-iRFP en cian). Las flechas señalan los ERES con cargos mezclados. El gráfico muestra el porcentaje medio de ERES que contienen un único cargo, los dos cargos mezclados y los cargos segregados dentro del mismo ERES. $n = 238$ en 32 células (*sec31-1*), 423 en 46 células (*sec31-1 gpi7Δ*) y 443 en 51 células (*sec31-1 gpi7Δcwh43Δ*) de tres réplicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Estadístico: T test no pareado de dos colas. $**p < 0,001$ y $*p < 0,05$. Figura adaptada de (Rodriguez-Gallardo et al., 2022).

3.2. Implicación del receptor p24 en el mecanismo de segregación selectiva de proteínas ancladas a GPI mediado por ceramidas

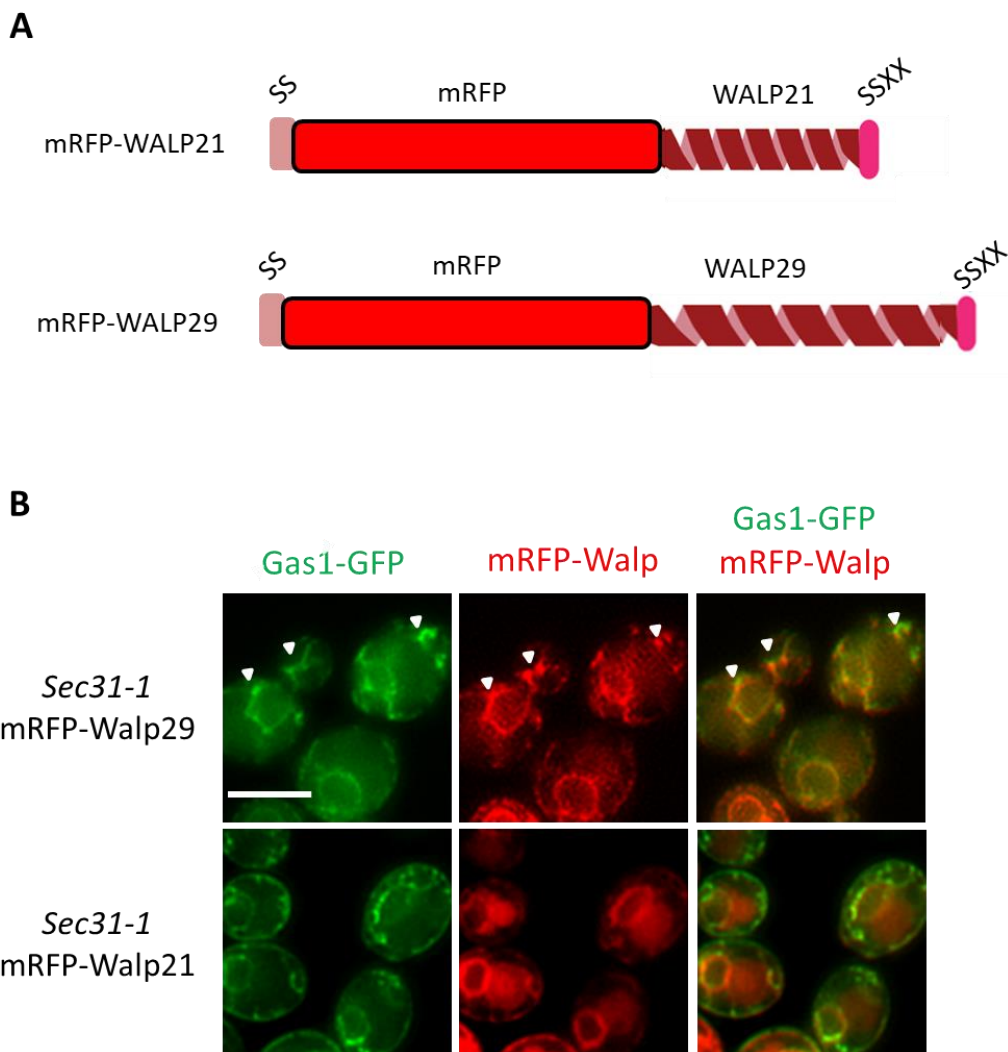
En este capítulo se trató de dilucidar el mecanismo por el que el receptor p24 y la ceramida C26 libre en la membrana del RE promueven la segregación y exportación selectiva de las proteínas ancladas a GPI con ceramida C26.

3.2.1. Los *clusters* de la proteína anclada a GPI Gas1 se localizan en zonas del RE con mayor grosor de membrana

Nuestros resultados previos sugieren que el receptor p24 podría contribuir a la formación de los *clusters* de la proteína anclada a GPI Gas1 en el RE promoviendo la generación de un microdominio enriquecido en ceramidas de cadena muy larga C26. El receptor p24 remodelaría localmente la membrana del RE, acumulando asimétricamente a las ceramidas C26 libres en la hemicapa citosólica. A su vez, en el lado luminal el receptor p24 interaccionaría de forma multivalente con las proteínas ancladas a GPI posicionando sus ceramidas C26 en la hemicapa luminal (Figura 21). La disposición enfrentada de ambos tipos de ceramidas C26 en la membrana del RE, podría promover su interdigitación parcial, generando un microdominio lipídico ordenado y de mayor grosor que las zonas de membrana circundante compuesta básicamente por glicerolípidos más cortos (16C y 18C) e insaturados (Ventura et al., 2020). Por tanto, este modelo predice que las proteínas ancladas a GPI deberían localizarse en zonas de la membrana del RE con un mayor grosor que el resto.

Para analizar esta predicción se adaptaron a nuestro sistema los marcadores fluorescentes WALP diseñados por el laboratorio de Yves Barral (ETH, Suiza) para mapear el grosor de la membrana del RE en levadura (Prasad et al., 2020). Estos marcadores constan de un dominio transmembrana (TMD) formado por la repetición del dipéptido Alanina (A)-Leucina (L) un número variable de veces, flanqueado por los residuos de triptófano (W) y prolina (P) (WALP). Se utilizaron dos marcadores etiquetados con mRFP en la región luminal con distinta longitud de su TMD, uno de 21 aa (mRFP-WALP21), longitud media de los TMD de las proteínas transmembranas del

RE, y otro de 29 aa (mRFP-WALP29), longitud más similar a los TMD encontrados en las proteínas transmembranas de la membrana plasmática, rica en esfingolípidos (Figura 33A). Cada construcción WALP fue co-expresada con Gas1-GFP en una cepa *sec31-1* lo que permitió visualizar mediante microscopía de fluorescencia convencional una posible co-localización de estos marcadores respecto a los *clusters* de Gas1-GFP. El marcador con TMD largo mRFP-WALP29 mostró un patrón de RE punteado y discontinuo, mientras que el marcador con TMD corto mRFP-WALP21 presentó una distribución homogénea, aunque restringida preferentemente al RE perinuclear. Los puntos discretos observados para mRFP-WALP29 co-localizaban con los *clusters* de Gas1-GFP (Figura 33B). Este resultado sugiere que los *clusters* de Gas1-GFP se localizan en zonas de mayor grosor de la membrana del RE, lo que sería consistente con una acumulación local de ceramidas de cadena muy larga C26.



RESULTADOS

Figura 33. El marcador de mayor longitud mRFP-WALP29 muestra un patrón punteado que co-localiza con los *clusters* de Gas1-GFP

(A) Figura adaptada de Prasad et al., 2020. Estructura de los dos marcadores usados etiquetados con mRFP formados por péptidos WALP con repeticiones variables de Alanina-Leucina. Estos constan de una secuencia de péptido señal proveniente de Suc2 (SS) para asegurar su localización en el RE y una secuencia de retención en el RE KKXX que fue sustituida por SSXX para permitir su exportación. (B) Las cepas *sec31-1* que expresaban Gas1-GFP bajo un promotor inducible de galactosa y mRFP-WALP21 o mRFP-WALP29, fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por microscopía de fluorescencia convencional tras 20 minutos de la liberación del bloqueo. Flechas blancas: *clusters* de Gas1-GFP que co-localizan con mRFP-WALPL29. Barra de escala, 5 µm.

3.2.1. Papel del dominio transmembrana de Emp24 en la formación de *clusters* de Gas1-GFP dependiente de ceramidas muy largas C26

A continuación, quisimos investigar si el aumento de grosor de la membrana del RE en las zonas donde se forman los *clusters* de Gas1-GFP pudiera deberse a la interdigitación parcial de ceramidas de cadena muy larga C26 presentes en ambas partes de la bicapa lipídica tal y como propone nuestro modelo. Nuestros datos previos de simulación de dinámica molecular (figura 20) sugieren que la porción citosólica del TMD de la proteína p24 Emp24 sería capaz de reclutar a las ceramidas C26 libres concentrándolas en la hemicapa citosólica de la membrana del RE, favoreciendo su interdigitación parcial con las ceramidas C26 de las proteínas ancladas al GPI de la hemicapa luminal. Para testar esta hipótesis diseñamos una construcción mutante de Emp24 en la cual se invirtió la secuencia del TMD (Emp24-Inv), quedando por tanto la porción citosólica de este TMD localizada en la hemicapa luminal de la membrana (Figura 34). Según nuestra hipótesis, Emp24-Inv debería invertir la localización de las ceramidas C26 libres, acumulándolas en la hemicapa luminal del RE lo que impediría que estas pudieran interdigitarse con las ceramidas C26 de las proteínas ancladas a GPI también localizadas en la hemicapa luminal.

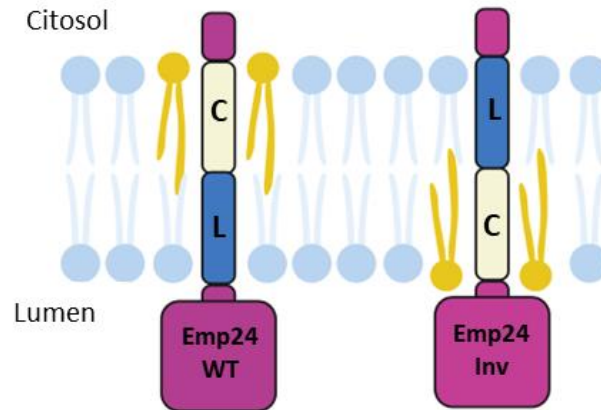


Figura 34. Generación de la construcción mutante Emp24-Inv

La secuencia del tallo transmembrana de la subunidad Emp24 fue invertida para generar Emp24-Inv. Secuencia TMD silvestre: WWSIFQLGTV I ANSLFQIYYL; secuencia TMD invertida: LYYIQFLSNA I VVGLQFISWW. C representa la región citosólica del TMD; L corresponde a la sección luminal del TMD. Las proteínas se encuentran insertadas en la membrana del RE, donde los lípidos azules corresponden a los fosfolípidos del RE y los amarillos a las ceramidas C26.

Emp24 constituye una subunidad esencial para el ensamblaje del complejo p24 ya que su eliminación mediante delección del gen *EMP24* provoca la desestabilización del complejo y la subsecuente degradación del resto de subunidades (Marzioch et al., 1999). Por este motivo, quisimos comprobar que tras la integración en el genoma de un mutante nulo *emp24Δ*, la construcción Emp24-Inv y el resto de subunidades del complejo p24 se expresan de forma similar a como lo hacen en una cepa silvestre. Mediante un ensayo de *Western Blot* verificamos que la construcción mutante Emp24-Inv se expresa con niveles parecidos a la proteína silvestre Emp24. Igualmente, también comprobamos que otro componente del complejo p24, la proteína p24 Erv25, se expresa en la cepa mutante al mismo nivel que en la cepa silvestre. (Figura 35A). Este resultado indica que Emp24-Inv no se degrada y se ensambla eficientemente con las otras subunidades para formar el complejo p24.

Tras caracterizar el nivel de expresión de Emp24-Inv analizamos su funcionalidad en relación con el transporte de Gas1. Mediante *Western Blot* determinamos que la cepa mutante Emp24-Inv acumula la forma de RE de Gas1 al igual que el mutante nulo *emp24Δ* (Figura 35A). Este resultado se confirmó por microscopía de fluorescencia convencional, observándose que la construcción mutante Emp24-Inv produce una

RESULTADOS

retención en el RE de Gas1-GFP similar a la observada en el mutante nulo *emp24Δ* (Figura 35B). Por tanto, Emp24-Inv no es funcional para Gas1 ya que no lo puede exportar eficientemente desde el RE. De hecho, comprobamos mediante un ensayo de co-inmunoprecipitación, que este defecto en el transporte de Gas1 se debe a su incapacidad para interactuar eficientemente con Emp24-Inv (Figura 36).

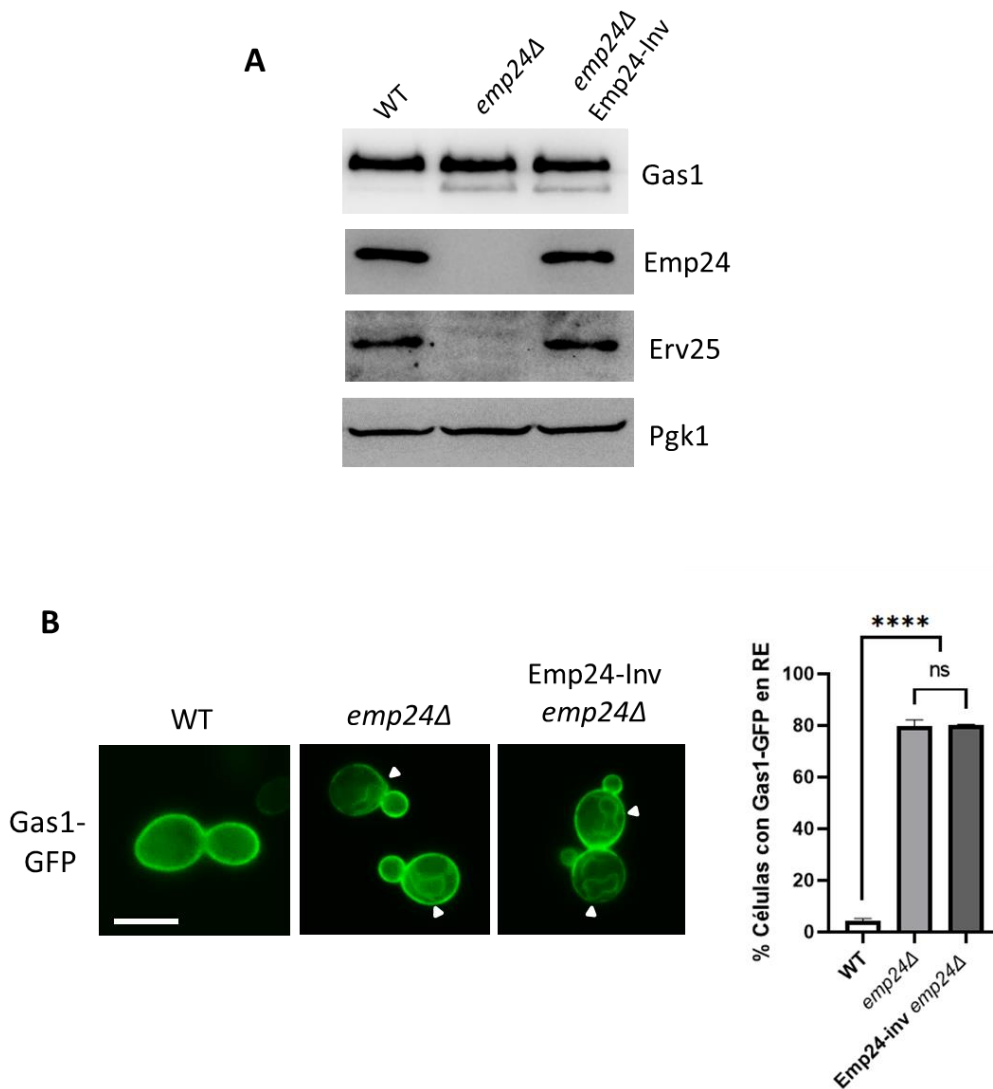


Figura 35. Gas1 es retenido en el RE en el mutante *emp24Δ* Emp24-Inv

(A) Los extractos obtenidos de las cepas silvestre y mutantes fueron analizados por *Western Blot* para las proteínas Gas1, Emp24, Erv25 y la proteína citosólica Pgk1 fue utilizada como control de carga. **(B)** Localización de Gas1-GFP analizada por microscopía de fluorescencia convencional. Flechas blancas: distribución de Gas1-GFP en el RE perinuclear. Barra de escala, 5 μm. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de células que muestran retención de Gas1-GFP en el RE. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Estadístico: Test T de *Student*, **** $p < 0,0001$; n.s., no significativo.

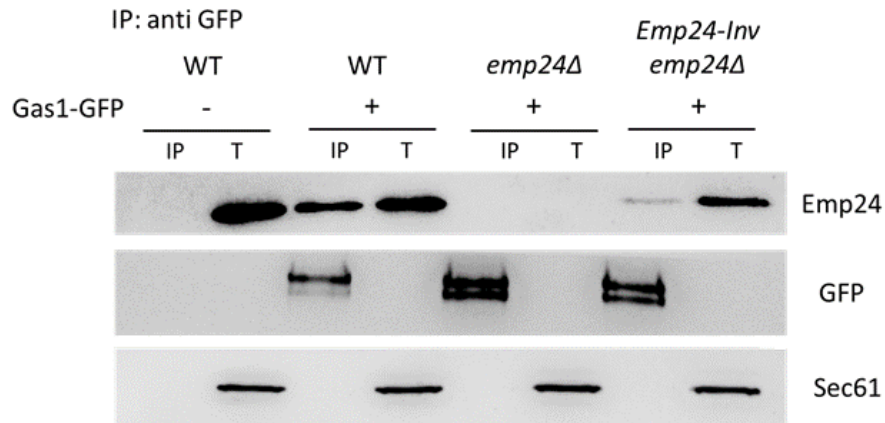


Figura 36. Gas1-GFP es incapaz de interactuar con la versión mutante del receptor Emp24-Inv

Ensayo de co-inmunoprecipitación entre Gas1-GFP y la subunidad del complejo p24, Emp24. Fracciones enriquecidas de RE de la cepa silvestre y las cepas mutantes que expresaban Gas1-GFP fueron procesadas y sometidas a inmunoprecipitación nativa. La interacción fue específica dado que la proteína Sec61 no se encontraba asociada a Gas1-GFP tras la inmunoprecipitación. El material inmunoprecipitado (IP) fue resuelto por SDS-PAGE y analizado por inmunoblotting con anticuerpos contra Emp24, Sec61 y GFP. Los totales (T) representan una fracción de las muestras previas a la inmunoprecipitación.

Puesto que nuestros resultados previos muestran que la interacción entre Gas1-GFP y el receptor p24 es crucial para la formación de *clusters* de Gas1-GFP, nos preguntamos si Emp24-Inv afecta a dicho proceso al no poder interactuar eficientemente con Gas1 como se muestra en la Figura 36. Para responder a esta pregunta empleamos el ensayo de *clustering* de Gas1-GFP establecido en nuestro laboratorio. Como se aprecia en la figura 37, los *clusters* de Gas1-GFP visibles en la cepa parental *sec31-1* no se formaron en la cepa mutante *sec31-1 Emp24-Inv* al igual que en *sec31-1 emp24Δ*. Por tanto, este resultado indica que la orientación del TMD de Emp24 es crítica para el proceso de formación de *clusters* de Gas1-GFP en el RE, lo que avalaría nuestro modelo por el que la acumulación de ceramidas C26 en la hemicapa citosólica entorno a Emp24 promueve el *clustering* y el *sorting* de Gas1 en ERES específicos.

RESULTADOS

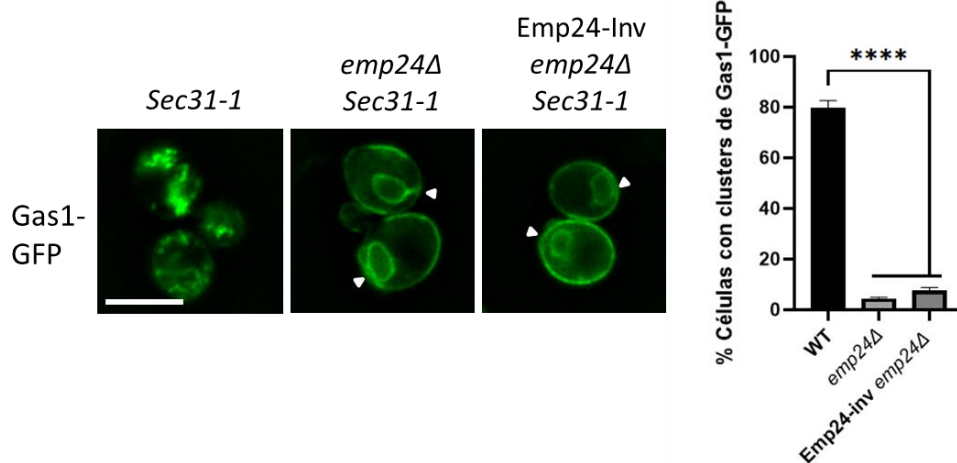


Figura 37. El mutante Emp24-Inv afecta a la generación de *clusters* de Gas1-GFP

Las cepas *sec31-1*, *sec31-1 emp24Δ* y *sec31-1 emp24Δ Emp24-Inv*, que expresaban Gas1-GFP bajo un promotor inducible de galactosa, fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos, a continuación, a 24 °C y visualizadas por microscopía de fluorescencia convencional tras 20 minutos de la liberación del bloqueo. Flechas blancas: Gas1-GFP con tinción específica de RE perinuclear. Barra de escala 5 μm. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de células con *clusters* de Gas1-GFP. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes y las barras de error la SD. Estadístico: Test T de *Student*, **** $p < 0,0001$.

Quisimos determinar si este defecto sobre el *clustering* y exportación de Gas1 provocado por el mutante Emp24-Inv está relacionado con una alteración en la distribución de las ceramidas libres de la membrana del RE. Se ha descrito previamente que la síntesis de ceramida es un requerimiento específico para la exportación desde el RE de las proteínas ancladas a GPI modificado con ceramida como Gas1 pero no para aquellas que contienen DAG (Yoko-O et al., 2018). De esta forma, si el mutante Emp24-Inv es incapaz de formar *clusters* de Gas1-GFP en el RE debido a que invierte la distribución de ceramidas libres acumulándolas en la hemicapa luminal, esperaríamos que este mutante no afecte al transporte de las proteínas ancladas a GPI con DAG al ser estas independientes de ceramida. Abordamos esta predicción mediante microscopía de fluorescencia y observamos que en la cepa mutante Emp24-Inv, la proteína anclada a GPI con DAG Cwp2-Venus fue mayoritariamente exportada del RE, al contrario que Gas1-GFP (Figura 38). De hecho, solo el 13% de estas células mostraron retención de Cwp2-Venus en el RE comparándolo con la cepa silvestre. Especulamos que este pequeño defecto podría deberse a que la acumulación potencial de ceramida en la cara luminal dificultaría de alguna forma la exportación de Cwp2-Venus desde el RE. Para

abordar esta posibilidad utilizamos al inhibidor de la síntesis de ceramida miriociina. Como se ha descrito previamente, el tratamiento con miriociina no afectó al transporte de Cwp2-Venus expresada en la cepa silvestre. Sin embargo, sí suprimió el pequeño defecto de exportación del RE de Cwp2-Venus observado en el mutante Emp24-Inv (Figura 38). En su conjunto, todos estos resultados sugieren que el defecto de exportación de Gas1-GFP producido por Emp24-Inv depende de la presencia de las ceramidas, las cuales podrían acumularse en la hemicapa luminal impidiendo su interdigitación e interfiriendo a su vez con la interacción entre Gas1-GFP y Emp24-Inv. Por tanto, los datos obtenidos son consistentes con la idea de que el TMD de Emp24 es capaz de remodelar localmente la membrana del RE, concentrando a la ceramida en la hemicapa citosólica, lo que favorecería la interdigitación de ceramidas y la formación de un dominio lipídico, que, a su vez, promueve el *clustering* y *sorting* en ERES específicos de proteínas ancladas a un GPI con ceramida como motivo lipídico.

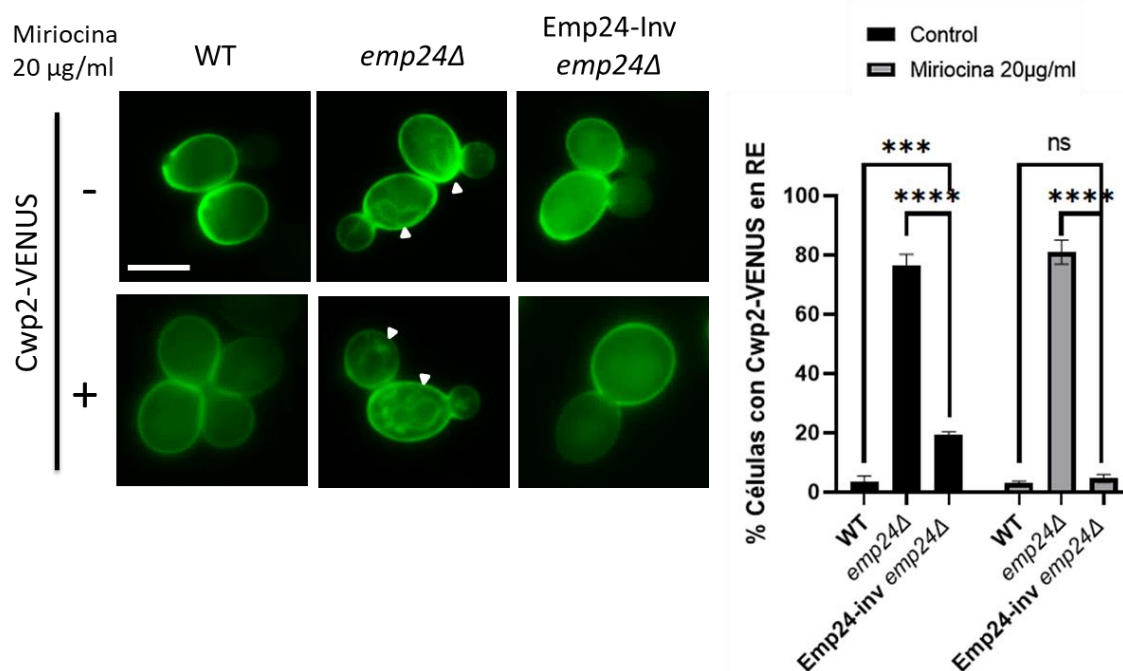


Figura 38. La ausencia de ceramida mejora el transporte de Cwp2-VENUS en Emp24-Inv

Localización de Cwp2-VENUS analizada por microscopía de fluorescencia convencional en las cepas WT, *emp24Δ* y Emp24-Inv *emp24Δ* tratadas o no con 20 µg/ml de Miriociina durante 1,5 h a 24 °C. Barra de escala, 5 µm. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de células que muestran retención de Cwp2-VENUS en el RE. Las barras representan la media de tres replicas biológicas independientes. Las barras de error representan la SD. Estadístico: Test T de Student, ****p < 0,0001; ***p < 0,001; n.s., no significativo

RESULTADOS

4. DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

4.1. Control de calidad ejercido sobre la segregación selectiva mediada por lípidos de las proteínas ancladas a GPI

Las proteínas ancladas a GPI son segregadas del resto de proteínas de secreción, incluidas las proteínas transmembrana, de forma temprana en el RE e incorporadas en vesículas COPII específicas (Muñiz et al., 2001; Muñiz & Riezman, 2016). Sin embargo, no se conoce todavía con exactitud el mecanismo responsable de este fenómeno. Recientemente hemos demostrado que la agrupación en zonas discretas del RE en forma de *clusters* y la consecuente segregación de las proteínas ancladas a GPI que contienen ceramida C26 como Gas1, depende de la presencia en la membrana de ceramidas C26 libres (Rodríguez-Gallardo et al., 2020). Esta observación apoya la hipótesis basada en las propiedades biofísicas de las ceramidas en la que las proteínas ancladas a GPI que contienen ceramida C26 tienden a coalescer junto con las ceramidas C26 libres para formar dominios lipídicos ordenados en la membrana del RE, favoreciendo la segregación de estas. No obstante, el papel de la ceramida C26 del GPI en este proceso estaba todavía por investigar.

En el presente estudio demostramos que el proceso de incorporación de ceramida C26 en el GPI realizado por la enzima Cwh43 es necesario para el *clustering* de Gas1 (Figura 23) y su segregación en ERES específicos (Figura 32). Es decir, la presencia de ceramida, ya sea libre en la membrana del RE o en la estructura del GPI, es esencial para la correcta exportación de Gas1. De hecho, mostramos que en el mutante *cwh43Δ*, cuando Gas1 no tiene ceramida C26 en su GPI, esta se acumula en el RE ya que es incapaz de interactuar con el receptor p24 (Figura 25), lo que se debía a la presencia de la 2^a-EtNP del glicano del GPI, como muestra el análisis de espectrometría de masas. Esto sugiere que la incorporación de ceramida en el GPI es supervisada por la enzima fosfodiesterasa Ted1, la cual elimina la 2^a-EtNP, permitiendo el reconocimiento por parte del complejo p24 y su exportación del RE. Por lo tanto, Ted1 podría estar actuando como un sistema de control de calidad en el RE, que elimina la EtNP solo después de que Cwh43 haya previamente incorporado la ceramida en el GPI, garantizando exclusivamente la salida del RE de proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramida C26.

DISCUSIÓN

Los mecanismos de control de calidad de la ruta secretora comienzan en el RE, donde el control de calidad canónico del RE facilita y monitoriza el plegamiento de las proteínas recién sintetizadas, con la consiguiente degradación de las proteínas mal plegadas (Araki & Nagata, 2011; Ellgaard & Helenius, 2003). En concreto, las proteínas ancladas a GPI mal plegadas son ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma (ERAD: *Endoplasmatic Reticulum Associated Degradation*) o mediante un proceso llamado exportación inducida por el estrés del RE (RESET) que depende del sistema de vacuola/lisosomas (Fujita & Jigami, 2008; Satpute-Krishnan et al., 2014; Sikorska et al., 2016). De hecho, ha sido demostrado, que la correcta deacilación del GPI por la enzima Bst1 participa en estos eventos de control de proteínas mal plegadas del RE (Fujita, Yoko-O, et al., 2006). Por esta razón, quisimos comprobar si la incorporación de ceramida por parte de Cwh43 estaba implicada en estos procesos de control de calidad. Sin embargo, a pesar de que la proteína anclada a GPI Gas1 era retenida en el RE en un mutante *cwh43Δ* (Figura 22), pudimos determinar que presentaba la misma tasa de degradación que la observada en una cepa silvestre (Figura 29). Estos datos indican que las proteínas ancladas a GPI remodeladas por la enzima Cwh43 no son eliminadas por degradación en el RE, lo que sugiere que la remodelación de ceramida no está implicada en el control de calidad de proteínas mal plegadas.

Es más, cuando la 2^a-EtNP no está presente, como ocurre en un mutante *gpi7Δ*, la proteína Gas1 que contiene DAG (Gas1-DAG) en lugar de ceramida es capaz de salir del RE a través de una ruta que es independiente de ceramida, ya que su exportación no se vio afectada por la miriocina, un inhibidor de la síntesis de ceramida (Figura 30). Además, Gas1-DAG pierde la capacidad de formar *clusters* en el RE y exportarse selectivamente a través de ERES específicos, siendo redirigida para entrar en los mismos ERES que exportan a las proteínas transmembrana (Figura 32). El hecho de que la actividad de Gpi7 sea necesaria para la incorporación de ceramida por Cwh43 (Benachour et al., 1999; Fujita, Umemura, et al., 2006; Umemura et al., 2007) y que la presencia de esta ceramida en el GPI sea posteriormente supervisada por la enzima Ted1, implica que el anclaje por Gpi7 y eliminación por Ted1 de la 2^a-EtNP actuarían conjuntamente como un sistema de control de calidad que monitoriza la correcta adquisición de ceramida

para asegurar la segregación selectiva de las proteínas ancladas a GPI con ceramida en ERES específicos que siguen una ruta de exportación del RE diferente al resto.

Nosotros proponemos que, bajo condiciones normales, este control de calidad aseguraría la incorporación de ceramida, retrasando la salida del RE de aquellas proteínas ancladas a GPI basadas en ceramida que todavía no han sido remodeladas. Una vez incorporada la ceramida por Cwh43, lo cual aseguraría su segregación en ERES específicos enriquecidos en ceramidas, Ted1 eliminaría la 2^a-EtNP, permitiendo la interacción con el receptor p24 y la exportación de estas proteínas del RE (Figura 39A). Cuando no se produce la incorporación de ceramida, como ocurre en un mutante *cwh43Δ*, Ted1 no es capaz de actuar, lo que conlleva la retención en el RE de estas proteínas que no han sido correctamente remodeladas (Figura 39B). Sin embargo, si el control de calidad es eliminado (*gpi7Δ*), el receptor p24 puede interactuar de forma prematura con estas proteínas ancladas a GPI en las que la ceramida no ha sido remodelada (*cwh43Δ*), permitiendo su salida del RE a través de los mismos ERES que el resto de proteínas transmembrana, al perder su capacidad de segregación en dominios ricos en ceramida (Figura 39C). Por tanto, la eliminación del control de calidad lleva a la incorrecta segregación de las proteínas ancladas a GPI basadas en ceramida en la membrana del RE.

A pesar de que, como se ha explicado, Ted1 estaría monitorizando la incorporación de ceramida en las proteínas ancladas a GPI, esta debe ser capaz de reconocer algo más allá de la porción lipídica, ya que también actúa en las proteínas ancladas a GPI modificadas con DAG como es el caso de Cwp2 (Manzano-Lopez et al., 2015). Esto implicaría que el control ejercido sobre la remodelación de ceramida dependería de la proteína que estuviera anclada al GPI. De acuerdo con esta hipótesis, se sabe que las proteínas ancladas a GPI modificadas con DAG o ceramida contienen secuencias diferentes aguas arriba del sitio de anclaje al GPI, el *omega site*, el cual se ha propuesto que podría estar involucrado en esta remodelación diferencial del lípido, decidiendo la incorporación o no de ceramida por Cwh43 (Yoko-O et al., 2018). Es más, se ha descrito que la especie lipídica presente repercutiría en su destino final, ya que se ha encontrado

DISCUSIÓN

que las proteínas ancladas a GPI con ceramida se localizan en la membrana plasmática mientras las que contienen DAG lo hacen en la pared celular (Yoko-O et al., 2018).

De esta manera, nuestros resultados junto con datos previos indican que la especie lipídica presente en el GPI estaría participando en la segregación específica de este tipo de proteínas en el RE, lo que estaría ligado a la determinación de su destino final. Por tanto, esta segregación dependiente de ceramida así como el control de calidad ejercido sobre la misma, podrían estar programando y asegurando de forma temprana, la organización funcional en la membrana plasmática de las proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramidas.

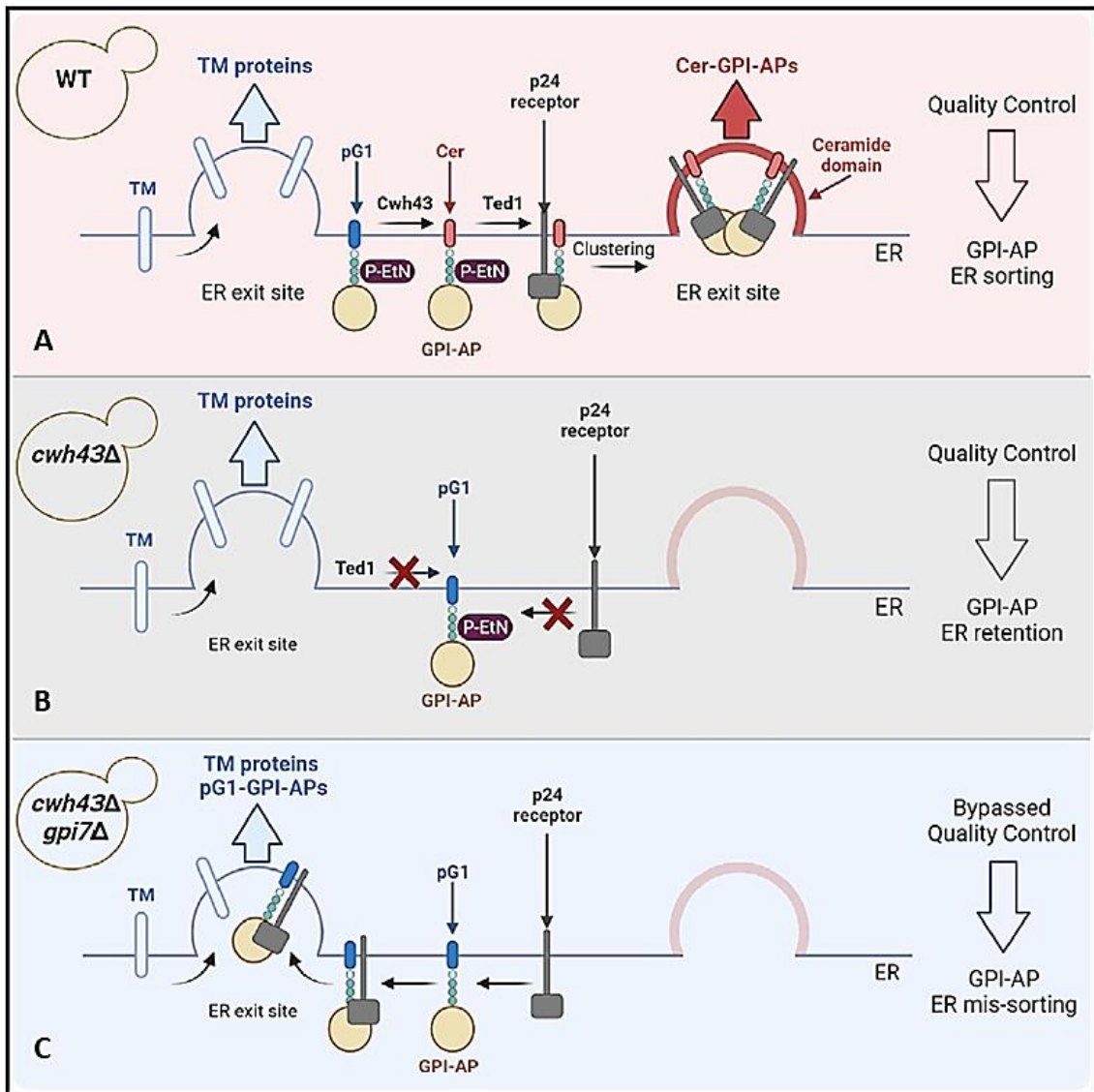


Figura 39. Modelo: Control de calidad sobre la segregación selectiva de las proteínas ancladas a GPI mediada por lípidos

(A) El control de calidad actúa asegurando la salida de proteínas ancladas a GPI que contienen ceramida. Solo tras la incorporación de la ceramida por Cwh43, la 2^a-EtNP es eliminada por Ted1, permitiendo la interacción con el receptor p24 y su segregación selectiva en ERES específicos enriquecidos en ceramida. **(B)** El control de calidad actúa impidiendo la salida de proteínas ancladas a GPI que no han remodelado correctamente la ceramida. Cuando la ceramida no es incorporada a la estructura del GPI, Ted1 no actúa y la 2^a-EtNP previene la interacción con el receptor p24 y, por tanto, la salida del RE. **(C)** El control de calidad es eliminado, lo que afecta a la segregación de las proteínas ancladas a GPI, que son ahora concentradas en los mismos ERES que el resto de proteínas. La ausencia de la 2^a-EtNP permite la interacción prematura de estas proteínas ancladas a GPI con el receptor p24, las cuales, gracias a la ausencia de ceramida en su estructura, pueden ser incorporadas en los mismos ERES que el resto de proteínas transmembrana. Figura extraída de (Rodríguez-Gallardo et al., 2022).

4.2. ¿Cuál es el mecanismo responsable de esta segregación selectiva mediada por lípidos?

Nuestro estudio previo reveló que, además de los lípidos, las proteínas también están implicadas en el proceso de *sorting* en el RE. De hecho, observamos que la formación de *clusters* de Gas1-GFP no dependía exclusivamente de la presencia de ceramida C26 en la membrana del RE, ya que las proteínas transmembrana componentes del receptor p24 también fueron necesarias para que se diera este proceso. Con objeto de entender cómo operan las proteínas p24 en el *clustering* mediado por ceramidas C26, empleamos un tipo determinado de simulación de dinámica molecular que ayuda a predecir como se organizan los lípidos de membrana entorno al dominio transmembrana de una proteína específica. Mediante esta técnica observamos que las ceramidas C26 libres de membrana se acumulan en la hemicapa citosólica alrededor del dominio transmembrana de Emp24, siendo excluidas de la hemicapa luminal (Figura 20), generándose por tanto una distribución asimétrica de las ceramidas C26 en la membrana. No obstante, este enriquecimiento asimétrico en la hemicapa citosólica también se observó para las ceramidas de cadena más corta C18. Dado que solo las ceramidas C26 (pero no las ceramidas C18) son capaces de segregar y exportar selectivamente a Gas1, el mecanismo responsable de este fenómeno debe estar relacionado con propiedades biofísicas únicas y especiales de las ceramidas C26.

De hecho, experimentos biofísicos han demostrado que, aunque tanto las ceramidas de cadena muy larga C24 como las de cadena más corta C18 pueden formar dominios lipídicos ordenados en liposomas (Castro et al., 2014; Goñi & Alonso, 2009), solo las ceramidas C24 son capaces de deformar la membrana generando curvatura (Pinto et al., 2011). Es más, esta capacidad de promover curvatura y plegamientos en la membrana se debe a la propiedad exclusiva de las ceramidas C24 para interdigitarse parcialmente formando fases de interdigitación que teóricamente incrementan el grosor de la membrana (Pinto et al., 2011; Ventura et al., 2020). De hecho, la existencia de estas fases interdigitadas de ceramida de cadena muy larga estaría en consonancia con el papel decisivo que juegan estos lípidos en el proceso de *clustering* y *sorting*, tanto las ceramidas C26 del GPI presente en lado luminal (esta tesis doctoral) como las ceramidas

libres, especulativamente acumuladas en la hemicapa citosólica alrededor del TMD de Emp24 según la simulación de dinámica molecular (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

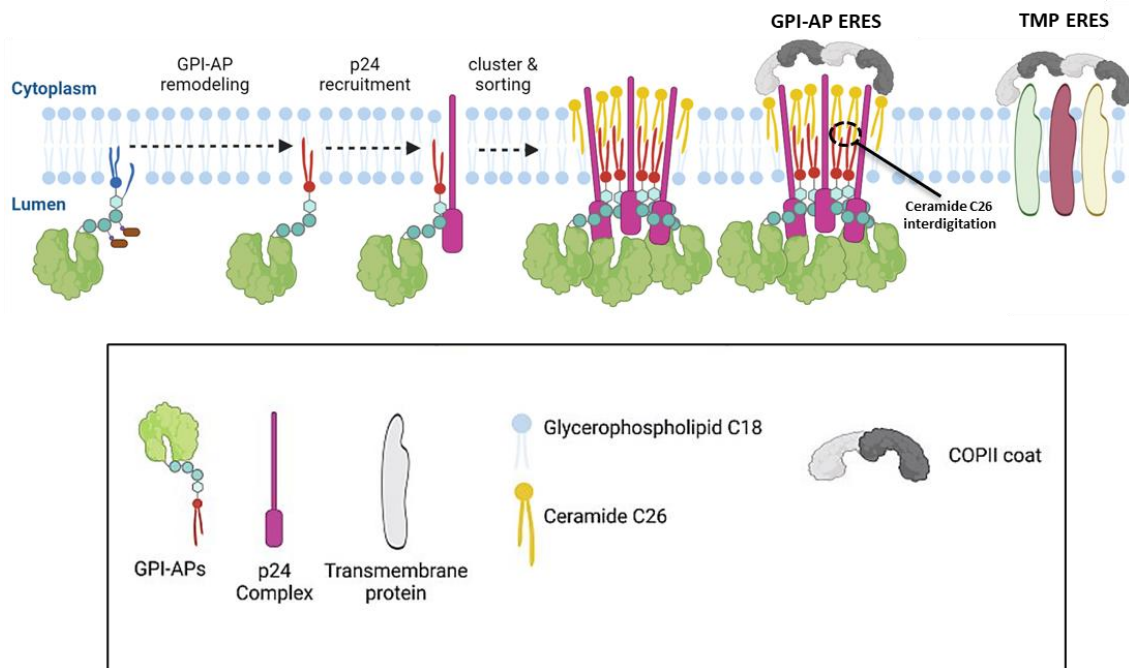


Figura 40. Modelo: Segregación de proteínas ancladas a GPI dependiente de la longitud del lípido mediado por el receptor p24

Las Proteínas ancladas a GPI correctamente remodeladas con ceramida interaccionarían con el receptor p24 a través de la sección luminal de su tallo transmembrana, mientras que se produciría una concentración de ceramida libre de C26 en la parte citosólica del mismo. La presencia de ceramidas muy larga a ambos lados de la membrana favorecería la interdigitación de estas lo cual promovería la curvatura de la membrana, llevando a la formación de *clusters* de proteínas ancladas a GPI y su segregación en ERESs específicos enriquecidos en ceramidas muy largas. Figura adaptada de (Aguilera-Romero & Muñiz, 2021).

Basándonos en estos datos, proponemos el siguiente mecanismo para la segregación dependiente de la longitud de la ceramida de las proteínas ancladas a GPI (Figura 40). El complejo p24 une a las proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramida en la cara luminal de la membrana del RE, mientras que, las ceramidas libres C26 serían acumuladas en el lado citosólico. La concentración local de ceramidas C26 alrededor de las proteínas p24 en ambos lados de la membrana del RE daría lugar a la interdigitación de las mismas, generándose fases de interdigitación que causarían la curvatura de la membrana y el *clustering* de las proteínas. Todo esto promovería finalmente la segregación de las proteínas ancladas a GPI y su incorporación selectiva en ERES

DISCUSIÓN

específicos, excluyendo a las proteínas transmembrana. Destacar que se ha observado que los ERES tienen preferencia por localizarse en zonas de alta curvatura (Okamoto et al., 2012).

Este modelo predice que las proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramida C26 deberían localizarse en zonas de la membrana del RE con un mayor espesor que el resto. Testamos esta predicción usando marcadores con diferente longitud de TMD, y observamos que solo el marcador con el TMD largo de 29 aa formó agregados en el RE que además co-localizaron con los clusters de Gas1-GFP (Figura 33). Este incremento local del espesor de la membrana del RE sería consistente con la formación de una fase lipídica en la que las ceramidas C26 interdigitan parcialmente (Ventura et al., 2020). Reforzando esta posibilidad, la longitud del TMD de 29 aa se correspondería con el espesor de membrana esperado cuando las ceramidas C26 interdigitan parcialmente (Prasad et al., 2020).

Otra predicción del modelo es que el dominio transmembrana de Emp24 debería ser esencial para generar la hipotética fase interdigitada de ceramidas y por tanto necesario para la formación de *clusters* de Gas1-GFP en el RE. Para testar esta predicción generamos una versión mutante de Emp24 en la que su dominio transmembrana está invertido (Emp24-Inv). Según nuestro modelo, el dominio transmembrana de Emp24 reorganiza a las ceramidas libres C26 de la membrana, acumulándolas en la hemicapa citosólica, entorno a sí mismo, lo que favorecería la formación de una fase interdigitada con las ceramidas C26 de las proteínas ancladas a GPI situadas en la hemicapa luminal. Por tanto, si nuestro modelo es correcto, esperaríamos que el mutante Emp24-Inv acumule ahora las ceramidas libres C26 en la hemicapa luminal junto con las ceramidas C26 de las proteínas ancladas a GPI, lo que impediría la formación de una fase interdigitada de ceramidas C26 y como consecuencia debería también afectar al proceso de *clustering*. De hecho, observamos que el mutante Emp24-Inv inhibió tanto la formación de *clusters* de Gas1 (Figura 37) como su exportación del RE (Figura 35). Comprobamos mediante co-inmunoprecipitación que esta retención de Gas1-GFP en el RE causada por el mutante Emp24-Inv se debe a una reducción en la interacción con el receptor p24 (Figura 36). Una posible explicación a este fenómeno podría ser que la

ceramida acumulada hipotéticamente por el mutante Emp24-Inv en el lado luminal en vez del citosólico, compitiera estéricamente con la ceramida de Gas1 por la unión al receptor p24. Finalmente confirmamos que este defecto en la exportación del RE es específico para las proteínas ancladas a GPI modificadas con ceramida como Gas1 ya que el mutante Emp24-Inv no afectó significativamente a la proteína anclada a GPI modificada con DAG Cwp2 en su salida del RE (Figura 38). Esta especificidad hacia las proteínas modificadas con ceramidas es consistente con la hipótesis en la que el dominio transmembrana de p24 estaría participando en la organización de la ceramida libre C26 en su entorno.

Sin embargo, si la proteína anclada a GPI basada en ceramida Gas1 es retenida en el RE en el mutante invertido debido a la presencia de ceramida libre en el lado luminal en torno al tallo de p24, esto nos lleva a preguntarnos por qué la proteína anclada a GPI basada en DAG Cwp2 no se ve afectada de la misma forma, puesto que ambas usan el mismo receptor p24. El receptor p24 se trata de un heterooligómero formado por componente de cuatro subfamilias; p24 α (Erp1, Erp5 y Erp6), p24 β (Emp24), p24 γ (Erp2, Erp3 y Erp4) y p24 δ (Erv25) (Carney & Bowen, 2004), no obstante, existe cierta redundancia funcional entre los miembros de las subfamilias en levaduras (Marzioch et al., 1999), aun así, hoy día se desconoce la distribución estequiométrica de las distintas subunidades o si esta redundancia funcional se debe a la existencia de diferentes complejos p24 que varían en cierto grado en las subunidades que lo forman. De ser esto así, cabría la posibilidad de que hubiera, al menos, dos tipos de complejos p24 ligeramente distintos; uno con las subunidades necesarias para favorecer la concentración de ceramidas largas C26 en la región citosólica, imprescindible para el transporte de las proteínas ancladas a GPI basadas en ceramida y, por otro lado, un complejo p24 encargado del transporte de las proteínas ancladas a GPI basadas en DAG, donde la presencia de ceramida no es necesaria. En este sentido se ha descrito recientemente que en células de mamíferos la proteína lipidada Wnt es exportada del RE por una combinación de proteínas p24 diferente a la utilizada por las proteínas ancladas a GPI (Tashima et al., 2022).

DISCUSIÓN

En resumen, estos resultados apoyan la idea de que el receptor p24 estaría organizando la composición lipídica alrededor de su tallo transmembrana, favoreciendo la generación de dominios ricos en ceramidas y proteínas ancladas a GPI basadas en ceramida, lo que llevaría a la segregación de las mismas en ERES específicos. Esta idea apoya el concepto general de que son las proteínas las que organizan a los lípidos para explotar sus propiedades biofísicas emergentes y así iniciar el *sorting* y no al contrario como propone el modelo clásico de la balsa lipídica, según el cual son los lípidos los que forman un dominio por autoensamblaje que atraería a las proteínas para iniciar el *sorting*.

4.3. Segregación selectiva de proteínas ancladas a GPI en mamíferos

Al contrario que en levaduras, en mamíferos la mayoría de las proteínas ancladas a GPI contienen un lípido éter en la estructura del GPI (Kanzawa et al., 2009; Kinoshita, 2020). A pesar de las diferencias estructurales entre estos lípidos éter y las ceramidas de cadena muy larga, un estudio reciente ha demostrado que ambos comparten propiedades fisicoquímicas y funciones similares (Jiménez-Rojo et al., 2020). Por tanto, este éter lípido presente en el GPI en mamíferos podría estar actuando de manera similar a la ceramida presente en el GPI en levaduras, ayudando a concentrar las proteínas ancladas a GPI en dominios ricos en ceramidas llevando a su segregación selectiva durante el transporte desde el RE. Este modelo implicaría una alta correlación entre las proteínas ancladas a GPI y las ceramidas de cadena muy larga, lo cual es apoyado por estudios previos en los cuales, tanto en levaduras como en mamíferos, la síntesis de GPI es necesaria para el correcto transporte al Golgi de las ceramidas de cadena muy larga (Kajiwara et al., 2008; Loizides-Mangold et al., 2012). De hecho, como en levaduras, el transporte de estas proteínas ancladas a GPI desde el RE al Golgi está también controlado por la eliminación de la EtNP de la segunda manosa por la enzima PGAP5 en el caso de células de mamífero (Fujita et al., 2009). Es decir, la segregación de las proteínas ancladas a GPI mediado por lípidos (éter en mamíferos y ceramida en levaduras) podría estar controlada por un mecanismo conservado evolutivamente que involucraría la remodelación del glicano del GPI. Sin embargo, la existencia común en mamíferos y levaduras de un control de calidad como el mencionado, así como el impacto que esto podría tener en la organización funcional de las proteínas ancladas a GPI en la superficie celular está aún por determinar.

DISCUSIÓN

5. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- 1.** La incorporación de ceramida C26 en el GPI realizada por la enzima Cwh43 es necesaria para la segregación de la proteína anclada a GPI Gas1 y su posterior exportación selectiva a través de ERES específicos.
- 2.** La enzima remodeladora del glicano del GPI Ted1 garantiza la segregación y exportación selectiva de Gas1 a través de ERES específicos monitorizando la correcta incorporación de ceramida C26 en el GPI.
- 3.** El receptor transmembrana p24 promueve la segregación de Gas1 favoreciendo la generación de dominios lipídicos de ceramidas C26 en la membrana del RE.

CONCLUSIONES

6. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Organismos y condiciones de cultivo

6.1.1. Cultivo de *Escherichia coli*

La amplificación y conservación a largo plazo de los plásmidos usados en este trabajo se llevaron a cabo en la estirpe de *E. coli* DH5 α . Los cultivos de *E. coli* se incubaron en agitadores orbitales a 37 °C y 250 rpm usando medio Luria-Bertani, LB (extracto de levadura 0,5%, bacto-triptona 1%, NaCl 0,5%) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina (Amp) cuando fue requerida la selección. En el caso del cultivo en medio sólido se complementó el medio LB con agar bacteriológico al 2%.

El material y los medios empleados fueron esterilizados mediante un ciclo de autoclave (20 min, 121 °C). Los antibióticos se incorporaron al medio a partir de una disolución concentrada, esterilizada por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 μ m de diámetro de poro, y teniendo en cuenta que la temperatura del medio no fuera superior a 50 °C. El medio LB con Amp puede ser almacenado a 4°C solo durante tres semanas para evitar la degradación del antibiótico.

Para la conservación de las estirpes bacterianas a largo plazo, se congelaron a -80 °C en una mezcla 1:1 de medio LB y glicerol 50%.

6.1.2. Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Las estirpes de levaduras utilizadas son derivadas de dos fondos genéticos principalmente: BY4742 y W303.

Tabla 1. Estirpes de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Referencia
BY4742	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY4741	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
FKY4579	MAT α <i>gpi7Δ::KANx6 emp24Δ::KANx6 his3 ura3 leu2 met15 lys2</i>	K. Funato

MATERIALES Y MÉTODOS

FKY4580	MATa <i>emp24Δ::KANx6 his3 leu2 ura3 met15 LYS2</i>	K. Funato
FKY4600	MATa <i>gpi7Δ::KANx6 his3 le2 ura3 met15 lys2</i>	K. Funato
FKY4601	MATα <i>cwh43Δ::KANx6 his3 le2 ura3 MET15 LYS2</i>	K. Funato
FKY4603	MATa <i>gpi7Δ::KANx6 cwh43Δ::KANx6 his3 le2 ura3 met15 lys2</i>	K. Funato
BY4742/YI5644	MATα <i>bst1Δ::KanMx4 ura3 leu2 his3 lys2</i>	EUROSCARF
BY4741/Y01432	MATa <i>ted1Δ::kanMx4 his3 leu2 ura3 met15</i>	EUROSCARF
MMY1528	MATα <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP ura3 leu2 his3 ade2</i>	S. Sabido-Bozo
MMY1562	MATα <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP bst1Δ::Hph ura3 leu2 ade2 his3 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY1563	MATα <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP Cwh43Δ::Hph ura3 leu2 ade2 his3 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY1583	MATα <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP GALprom-MID2-iRFP::URA3 leu2 his3 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY1584	MATα <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP gpi7Δ::KAN MID2-iRFP::URA3 leu2 his3 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY1760	MATα <i>sec31-1 sec13-mCherry::TRP1 Gal-P-MID2-iRFP::URA3 gpi7Δ::KanMx cwh43Δ::Hph leu2 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY2853	MATα <i>sec31-1 mRFP-WALP29-ssxx::URA3 ura3 leu2 his3 ade2 trip1</i>	S. Sabido-Bozo
MMY1854	MATα <i>sec31-1 sec31-1 mRFP-WALP21-ssxx::URA3 ura3 leu2 his3 ade2 trip1</i>	S. Sabido-Bozo
RH4442	MATα <i>emp24Δ::kanMx4 ura3 leu2 ade2 ade3 his3 trp1 bar1 (W303)</i>	H. Riezman
VGY381	MATa <i>ura3-1 leu2-3 his3-11 trp1-1 ade2-1 can1-100</i>	V. Goder
MMY1811	MATα <i>emp24Δ::kanMx4 EMP24-inv::TRP1 ura3 leu2 ade2 ade3 his3 trp1 bar1 (W303)</i>	S. Sabido-Bozo

MMY1594	MAT α <i>sec31-1 SEC13-mCherry::TRP emp24Δ::Hph ura3 leu2 his3 ade2</i>	S. Rodriguez
MMY1857	MAT α <i>sec31-1 emp24Δ::Hph EMP24-inv::TRP1 ura3 leu2 his3 ade2 ade3 trp1</i>	S. Sabido-Bozo

Las levaduras se cultivaron en medio completo (YPD) o en medio mínimo sintético (SC). La composición del medio YPD fue 1% de extracto de levadura, 2% de peptona, suplementado con 0.2% de adenina y uracilo y conteniendo 2% de glucosa (YPD), rafinosa (YPR) o galactosa (YPG) como fuente de carbono. Cuando se requirió crecer las células en medios selectivos se usó medio mínimo (SC: glucosa 2% o SG: galactosa 2%, Base Nitrogenada de levadura (YNB; Difco) 0,67%) suplementado con 40 mg/l de aminoácidos y bases nitrogenadas (uracilo, adenina, L-triptófano, L-histidina, L-leucina, L-lisina y/o L-metionina), dependiendo de las auxotrofías de las estirpes a cultivar. Las placas de medio completo, YPD, y medio mínimo, SC, se obtuvieron suplementando con 2% de agar bacteriológico el medio líquido, y su posterior esterilización en autoclave. Cuando fue necesario se añadieron antibióticos al medio sólido a 55°C: 200 μ g/ml G-418 (Sigma) o 150 μ g/ml Higromicina B (Amresco). La esterilización se llevó a cabo mediante un ciclo en autoclave (20 min, 121 °C), excepto las soluciones concentradas de YNB y de L-triptófano que se filtraron y añadieron posteriormente al medio.

Las levaduras se incubaron a 24 °C en agitación (250 rpm) en tubos de 12ml o matraces Erlenmeyer y se dejaron crecer en las mismas condiciones sin sobrepasar una DO₆₀₀ igual a 1 durante el tiempo necesario para obtener el número total de células necesario para cada experimento.

Para la conservación de las estirpes a largo plazo, se congelaron a -80°C en una mezcla 1:1 de medio YPD y 50% glicerol.

Para la esporulación, los diploides crecieron durante 24 horas en medio de pre-esporulación, Pre-SPO (glucosa 10%, extracto de levadura 0,8%, peptona 0,3%, agar 2%) y posteriormente se transfirieron a medio de esporulación, SPO (acetato potásico 1%, glucosa 0,05%, extracto de levadura 0,1%, agar 2%). Para la determinación del sexo de

MATERIALES Y MÉTODOS

las cepas tras la micromanipulación se recurrió a placas de halo. Se empleó medio YPD acidificado hasta pH 5,5 con HCl (Panreac), para la base de las placas. Para el medio de cobertera se redujo la concentración de agar bacteriológico hasta 0,8%. Las células hipersensibles al factor alfa (RH123) se añadieron cuando el medio de cobertera esterilizado se enfrió hasta 45°C. Posteriormente, se añadieron 5 ml de dicha suspensión celular sobre las placas de YPD pH 5,5.

6.2. Técnicas genéticas

6.2.1. Técnicas de manipulación de ADN

Las técnicas básicas de manipulación de AND fueron realizadas como se describe en el manual *Sambrook & Russell* (Sambrook, 2001).

6.2.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las PCRs se realizaron con una AND polimerasa de alta fidelidad, *VELOCITY DNA polymerase* (Bioline) siguiendo las indicaciones del manual de la enzima. Se empleó el termociclador MJ Mini (Bio-Rad). El AND fue purificado usando el producto *ISOLATE II PCR and Gel Kit* (Bioline). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa StabVida.

6.2.1.2. Restricción enzimática y ligación de plásmidos o fragmentos de ADN

Las enzimas de restricción y la ligasa (T4 DNA ligase) fueron adquiridas de la empresa *New England Biolabs*. Las reacciones fueron llevadas a cabo tal y como se especifica en las recomendaciones del fabricante. Para prevenir la religación de los plásmidos digeridos se desfosforilaron los extremos con fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich).

6.2.1.3. Separación y visualización de los fragmentos de ADN en geles de agarosa

La separación de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) con una concentración de agarosa (p/v) del 1%. Las muestras se suplementaron con tampón de carga (1 mM EDTA pH 8, azul de bromofenol 0,25%, glicerol 50%). Las electroforesis se llevaron a cabo en cubetas horizontales de BioRad, aplicando un voltaje constante de 120V.

Para la detección del ADN en los geles y su visualización, éstos se sumergieron en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 20 minutos. La visualización de los geles se llevó a cabo con un transiluminador de luz ultravioleta. La extracción y purificación de fragmentos de ADN de geles de agarosa fue realizada usando el producto *ISOLATE II PCR and Gel Kit* (Bioline). Para estimar la pureza y la concentración del AND obtenido se usó un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000.

6.2.2. Purificación de ADN desde *Escherichia coli*

La purificación de plásmidos a partir de estirpes de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina con las soluciones proporcionadas en el kit MIDIPrep (Sigma-Aldrich). Se partió de cultivos de *E. coli* suplementados con 100 µg/ml de ampicilina como marcador selectivo, habiendo crecido toda la noche a 37 °C en agitación, se recogió por centrifugación (5 min a 3.000 g) en tubos de 1,5 ml. El precipitado celular se resuspendió en 100 µl de solución I (*Resuspension solution*: 25 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM glucosa, 10 mM EDTA pH 8), se añadieron 200 µl de solución II (*Lysis solution*: 0,2 N NaOH, SDS 1% (p/v)) y se mezclaron las muestras invirtiendo suavemente. Para neutralizar, se añadieron 150 µl de solución III (*Neutralization solution*: 5 M acetato potásico pH 4,8) y se volvió a mezclar invirtiendo los tubos. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 15 min a 13.000 g, tras lo que se retiró el sobrenadante a un nuevo tubo. El ADN se precipitó a partir de los sobrenadantes de la fase acuosa mediante la adición de 1 ml de etanol absoluto e incubación a -20 °C durante 30 minutos. El precipitado de ADN se

MATERIALES Y MÉTODOS

lavó dos veces con 1 ml de disolución de etanol al 70% (v/v) en agua. Tras eliminar el sobrenadante, se dejó secar al aire y se resuspendió en 40 μl de $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$.

6.2.3. Transformación de *Escherichia coli*

La transformación de células competentes DH5 α se realizó añadiendo a la suspensión celular, previamente descongelada en hielo, el ADN en un volumen máximo de 10 μl . Tras 30 minutos de incubación en hielo, se sometieron a un choque térmico a 42 $^{\circ}\text{C}$ durante 40 segundos. Posteriormente se incubaron en hielo durante 5 minutos. A continuación, se añadió 1 ml de medio LB y se incubaron 2 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se sembraron 100 μl de cultivo en placas de medio LB con el antibiótico para la selección y se dejaron crecer en una estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ toda la noche.

6.2.4. Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

6.2.4.1. Método *One Step*

Para la transformación de levaduras con plásmidos se usó el método *One-step* (Chen et al., 1992). Se partió de 5×10^7 células viables en suspensión. Las células se lavaron dos veces con agua destilada. A continuación, se centrifugaron y resuspendieron en 100 μl de tampón *One-Step* (0,2 M acetato de litio, PEG-4000 40%, 100 mM DTT) por transformación. Después se añadió 1 μl del plásmido de interés y 2 μl de ADN monocatenario desnaturalizado procedente de esperma de salmón (Sigma). Se mezcló usando un *vórtex* y se incubó a 45 $^{\circ}\text{C}$ durante 30-40 minutos. Para terminar, se sembró en medio selectivo y se incubó a temperatura óptima durante tres días.

6.2.4.2. Método Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier DNA/Polyethylene Glycol

La transformación de levadura con AND linearizado, fragmentos de PCR o plásmidos integrativos se llevó a cabo usando el método *Lithium Acetate/Single-Stranded Carrier*

DNA/Polyethylene Glycol Method como se describe en (Gietz & Schiestl, 2007; Gietz & Woods, 2002).

Se inocularon 10 ml de YPD por transformación y se incubaron a 30°C y 250 rpm. Después de varios ciclos de crecimiento, las células fueron recolectadas cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica comprendida entre 0,4-0,7 O.D₆₀₀. Las células fueron lavadas dos veces con 25 ml de H₂O_{dd} y transferidas a tubos de 1,5 ml, donde fueron lavadas una vez con 1 ml de 0,1 M LiAc. El pellet fue resuspendido y alicuotado en 50 µl de 0,1 M LiAc por transformación. Previa centrifugación, el pellet fue resuspendido en TRAF0 (240 µl de PEG 3350 50% (p/v), 36 µl de Acetato de Litio 1.0 M, 10 µl SS-CarrierDNA (2 mg/ml)), a lo que se le añadió 1-2 µg del AND linearizado y H₂O_{dd} hasta completar un volumen final de 360 µl. Los tubos fueron mezclados por vortex durante 1 minuto e incubados a 30 °C (24 °C para cepas termosensibles) durante 30 minutos, seguido de un choque térmico a 42 °C durante 15 minutos. El sobrenadante fue eliminado mediante centrifugación y las células fueron incubadas en 1 ml de YPD o SC durante 2-3 horas. Finalmente, fueron sembradas en placas del medio selectivo apropiado.

6.2.5. Cruce, esporulación y disección de tétradas

Con el objetivo de obtener levaduras diploides, se mezclaron estirpes de sexo (*MAT*) complementarios, α y *a*, en placas de YPD y se incubó 12 horas. A continuación, para seleccionar los diploides se transfirieron las células a una placa de SC en ausencia de dos requerimientos, de modo que el diploide pudiera crecer, pero las estirpes parentales haploides no pudieran. En algunos casos fue necesaria la incubación a temperaturas restrictivas (37°) para ciertos alelos. Tras 1 o 2 días para enriquecer los diploides, estos se transfirieron a placas de Pre-SPO para potenciar el gasto de las reservas de nitrógeno, y finalmente se transfirieron a medio SPO. Tras una semana aproximadamente, las tétradas se separaron empleando un microscopio para disección (*Singer Instrument*), y se promovió la germinación cultivando en YPD a 24 °C.

MATERIALES Y MÉTODOS

Finalmente, se comprobaron los diferentes marcadores mediante réplicas en placa. Las tétradas diseccionadas en una placa madre se transfirieron a un terciopelo estéril con el cual se replicó a placas de los medios selectivos de interés que se incubaron a 24 °C durante 24-48 horas para la posterior comprobación del crecimiento. Para el análisis de mutantes termosensibles, se replicó en placas YPD que se incubaron a 37 °C durante 24-48 horas.

La comprobación del sexo de las esporas generadas se realizó replicando en placas de halo. Tras la incubación a 24 °C durante 24-48 horas, las cepas MAT α generaron un halo de inhibición de crecimiento en la cepa RH123 (hipersensible a factor alfa) presente en el agar de cobertera, mientras que las MAT a no lo hicieron.

6.2.6. Construcción de plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran detallados en la Tabla 2.

Tabla 2. Plásmidos de expresión en levaduras empleados en este trabajo.

Plásmido	Características			Referencia
Gas1-GFP	pRS416-GAS1-GFP	URA3	CEN	L. Popolo
3079	p415-MID2-VENUS	LEU2	CEN	G. Castellón
pRGS6	Gal-promoter-Gas1-GFP	LEU2	2 μ	S. Rodriguez
pRGS7	Gal-promoter-Mid2-iRFP	URA3	Integrativo	S. Rodriguez
pRS416	pRS416	URA3	CEN	A.Aguilera
pMF607	pRS305-HA-GAS1	LEU2	CEN	M. Fujita
p416-ADH-TED1VENUS	p416-ADH-TED1-VENUS	URA3	CEN	M. Taylor
pMO13	GFP-HDEL	URA3	CEN	T. Yoko-o
Cwp2-VENUS	Cwp2-VENUS	URA3	CEN	G. Castillon

pSBS11	pRS306-GDP-SS-mRFP-WALP29-SSXX	URA3	Integrativo	Este estudio
pSBS12	pRS306-GDP-SS-mRFP-WALP21-SSXX	URA3	Integrativo	Este estudio
pSBS3	EMP24-Inv	TRP1	Integrativo	Este estudio

Para la generación de los plásmidos pSBS11 y pSBS12 se partió de la secuencia del plásmido p303-GDP-SS-GFP-WALP21-KKXX amablemente proporcionada por el Dr. Yves Barral (Prasad et al., 2020). La secuencia consta de un tallo transmembrana sintético constituido por 10 repeticiones del dipéptido Alanina-Leucina (AL) rodeado por triptófanos (WALP), la cual se ha etiquetado con GFP tras la secuencia señal (SS) y a la que se ha añadido una secuencia de retención en el RE (KKXX). En el caso de pSBS12 la etiqueta fue sustituida por mRFP y se eliminó la secuencia de retención en RE (SSXX). Las repeticiones del dipéptido AL se extendieron a 14 para generar el WALP29 del plásmido pSBS11. Una vez diseñadas las secuencias, se ordenaron sintetizar y clonar en el vector pRS306 a la empresa Genscript.

Para la generación de pSBS3 se diseñó una secuencia en la cual el tallo transmembrana de la proteína Emp24 fue invertido (secuencia silvestre: WWSIFQLGVVIANSLFQIYYL; secuencia invertida: LYYIQFLSNAIVVGLQFISWW). Esta se mandó sintetizar a Genscript con un margen de 1Kba aguas arriba y aguas abajo del gen para asegurar la presencia del promotor y terminador endógenos. A continuación, la secuencia se clonó en un vector pRS304, gracias a los oligos Fwd-GACTGCTCGAGTTTCTACAAATATTGCTAAA y Rvs-CACTAGAATTCCGGACCACAGCATGTCCTGT y las enzimas de restricción XhoI y EcoRI.

6.3. Técnicas bioquímicas

6.3.1. Extractos celulares de levadura

Para la obtención de extractos celulares de levadura se siguió el método basado en la rotura mecánica. Se recogieron entre $1-2 \times 10^7$ células y se lavaron dos veces con agua

MATERIALES Y MÉTODOS

destilada. A continuación, el pellet fue resuspendido en 150 μ l de Tampón de carga Laemli 2X (SDS 2%, 200 mM β -mercaptoetanol, glicerol 20%, 120 mM Tris-HCl pH 6,8, azul de bromofenol 0,002%) suplementado con 0.5 mM PMSF (Amresco) y 1 μ g/ml de mezcla de inhibidores de proteasas (antipapaína, leupeptina y pepstatina (Sigma)). Se añadieron 200 μ l de bolas de vidrio libres de materia orgánica (Sigma) y se sometieron a rotura mecánica mediante *Beadbeater* (BioSpec). Finalmente, se calentó a 95 $^{\circ}$ C durante 5 minutos y se centrifugó a máxima revolución durante 5 minutos. Las muestras se analizaron por electroforesis en SDS-PAGE e inmunoblot.

6.3.2. Electroforesis en geles de acril-amida

Las electroforesis en geles de acrilamida fueron llevadas a cabo en el sistema *Mini-protean* (Bio-Rad). Como patrón de peso molecular de proteínas se empleó *Precision Plus Protein Dual Color* (Bio-Rad). Antes de cargar las muestras en el gel, éstas se calentaron a 95 $^{\circ}$ C durante 5 min.

Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se realizaron en geles de poliacrilamida que contenían SDS (en adelante SDS/PAGE). El gel separador se preparó en tampón (375 mM Tris-HCl pH 8,8, SDS 0,1%), al 7,5% (p/v) de poliacrilamida a partir de acrilamida:bisacrilamida 37,5:1 40% (Amresco). El gel de empaquetamiento de las muestras se preparó al 5,25% (p/v) de poliacrilamida en tampón (125 mM Tris-HCl pH 6,8, SDS 0,1%). Los geles se polimerizaron con APS 0,1% (p/v), usando como agente catalizador TEMED a una concentración final de 6 mM. La electroforesis se llevó a cabo a 20 mA/gel, amperaje constante. Para el desarrollo de la electroforesis se utilizó como tampón 25 mM Tris-HCl, 0,32 M glicina (pH 8,3) y SDS 0,1% (p/v).

6.3.3. Western blots y anticuerpos

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando el sistema Trans-Blot Turbo (Bio-Rad). Tras la transferencia, ésta se comprobó mediante la tinción reversible con Rojo *Ponceau*.

A continuación, se empleó como solución de bloqueo TBS-Tween 20 (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, Tween 20 1%) complementado con 5% (p/v) de leche desnatada en polvo. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C. La incubación con los anticuerpos primarios se realizó en solución de bloqueo conteniendo los anticuerpos a una concentración determinada (ver tabla 3) durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó con solución de bloqueo 6 veces durante 5 minutos para eliminar los restos de anticuerpo primario. A continuación, se añadió la solución con anticuerpo secundario (conjugados a peroxidasa de rábano (Pierce)) a una concentración determinada (ver tabla 3). Tras 1 hora de incubación se eliminaron los restos de anticuerpo, así como de leche, lavando al menos 6 veces con TBS-Tween 20 durante 3-5 minutos. Para la detección de la quimioluminiscencia de los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa se empleó el kit de detección *West Pico Signal* (Pierce). Las membranas fueron sumergidas en dicha solución y expuestas en el dispositivo ChemiDoc MP (Bio-Rad) durante el tiempo necesario para la detección. La cuantificación de la quimioluminiscencia se realizó con el programa FIJI. Los anticuerpos usados se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos usados en este trabajo.

Antígeno	Origen	Tipo	Dilución	Referencia
GFP	Conejo	Primario-policlonal	1:3000	H. Riezman
Emp24	Conejo	Primario-policlonal	1:500	H. Riezman
Gas1	Conejo	Primario-policlonal	1:3000	H. Riezman
Pgk1	Ratón	Primario-monoclonal	1:10000	J. de la Cruz
Wbp1	Conejo	Primario-policlonal	1:1500	H. Riezman
IgG de conejo	Cabra	Secundario + HRP	1:3000	Pierce
IgG de ratón	Cabra	Secundario + HRP	1:2000	Pierce

6.3.4. *Stripping*

Las membranas procedentes del *Western Blot* previo se lavaron 3 veces con TBS Tween-20 durante 3-5 minutos, eliminando así los restos de leche. A continuación, se incubaron

MATERIALES Y MÉTODOS

durante 15 minutos a temperatura ambiente en una solución que contiene; TBS-Tween-20, 100mM de β -mercaptoetanol y 2% de SDS. Posteriormente se eliminaron los restos de este tampón lavando las membranas 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween-20 y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en el tampón de *stripping* (25mM Glicina-HCl, pH2, 1% SDS). Por último, las membranas fueron conservadas en tampón TBS-Tween-20 complementado con 5% (p/v) de leche en polvo o sometidas a otro *Western Blot* directamente.

6.3.5. Ensayo de co-inmunoprecipitación

Para estudiar la interacción *in vivo* entre proteínas se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación en fracciones enriquecidas en RE, tal y como se describe en (Rodríguez-Gallardo et al., 2020).

Para ello, se partió de cultivos de levadura en fase exponencial. Se recogieron 100×10^7 células, las cuales fueron lavadas dos veces en tampón TNE (50 mM tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA) suplementado con 0,5 mM PMSF, 1 μ g/ml de mezcla de inhibidores de proteasas y rotas con bolas de vidrio en *beadbeater*. A continuación, las bolas de vidrio y las células no rotas fueron eliminadas mediante centrifugación a 1.000 *g* durante 10 minutos. El sobrenadante fue centrifugado a 13.000 *g* durante 15 minutos a 4 °C para obtener las fracciones enriquecidas en RE. El pellet fue resuspendido en TNE 1% Digitonina y la suspensión fue incubada 1 hora a 4 °C con rotación. Tras la incubación con el detergente, se eliminaron los contenidos insolubles centrifugando a 17.000 *g* durante 1 hora a 4 °C. Para la inmunoprecipitación de Gas1-GFP, las muestras fueron primero preincubadas con bolas de agarosa vacías (ChromoTek) a 4 °C durante 1 hora (Bloqueo) y posteriormente incubadas con bolas con anticuerpos GFP-Trap_A (ChromoTek) a 4 °C durante 3 horas. Tras la inmunoprecipitación, las bolas fueron lavadas cinco veces con TNE 0,2 % Digitonina y eluídas en tampón de carga Laemli 2X. Las muestras fueron analizadas por SDS-PAGE e inmunoblot.

6.3.6. Pulso y caza

El análisis de Gas1-GFP por pulso y caza con [³⁵S]-metionina fue realizado tal y como se describe en (Kajiwara et al., 2008).

Las células fueron crecidas toda la noche en SDYE (2% glucosa, 1% extracto de levadura YNB 0,67%, suplementado con 40 mg/l de aminoácidos) y lavadas dos veces con SC sin metionina. Se tomaron 3×10^7 células por punto de tiempo y fueron resuspendidas e incubadas durante 15 minutos en 0,5 ml/punto de SC sin metionina. A continuación, se sometieron a un pulso de 5 minutos con 100 μ Ci/punto de S³⁵ (Perkin Elmer), tras lo cual se procedió a la caza para los tiempos indicados (0, 30 y 60 minutos). La caza se inició añadiendo el volumen necesario de la mezcla 100X: 0.3% metionina, 0.3% cisteína y 0,3 M de sulfato de amonio. A los tiempos indicados, las muestras fueron tomadas y añadidas a microtubos que contenían azida y fluoruro de sodio a una concentración final de 10 mM. Las células marcadas radioactivamente fueron resuspendidas en TEPI (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 1 μ g/ml inhibidor de proteasas) y rotas en vortex durante 15 minutos a 4 °C con bolas de vidrio. El lisado se calentó a 95 °C durante 5 minutos en presencia de SDS al 1%, tras lo cual se centrifugó durante 15 minutos. El sobrenadante se añadió a 5 ml de TNET (TNE al 1% de Triton X-100) y fue incubado con 100 μ l de bolas de proteína A-sefarosa (ThermoFisher Scientific) y anticuerpo contra Gas1 durante 3 horas a 4 °C. Las bolas fueron lavadas cuatro veces con TNET y luego resuspendidas en tampón Laemli. El inmunoprecipitado fue analizado por SDS-PAGE con la consiguiente exposición y cuantificación del gel en un PhosphorImager (FujiFilm FLA5100). El porcentaje de proteína Gas1 madura fue determinado tomando la proporción de la forma madura de 125 KDa con respecto al total de la señal (bandas de 125 KDa y 105 KDa) y multiplicándolo por 100.

6.3.7. Análisis de la composición lipídica celular *in vivo*

El marcaje *in vivo* de lípidos con [³H]myo-inositol fue realizado tal y como se describe en (Ikeda et al., 2021).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los lípidos marcados fueron extraídos con cloroformo-metanol-agua (10:10:3, vol/vol/vol) y analizados por cromatografía de capa fina (*Thin Layer Chromatography*) usando un sistema de solventes (cloroformo-metanol-0,25% KCL (55:45:10, vol/vol/vol)) para esfingolípidos complejos. Los esfingolípidos marcados fueron visualizados y cuantificados usando un sistema FLA-7000 (FujiFilm).

6.4. Análisis del glicano del GPI por espectrometría de masas

Las células (600×10^7), que expresaban Gas1-GFP, fueron lavadas dos veces en tampón TNE y rotas con bolas de vidrio, tras lo cual, dichas bolas y las células no rotas fueron eliminadas por centrifugación. El sobrenadante se sometió a una centrifugación a 17.000 g durante 1 h a 4 °C. El pellet fue incubado con 1U de PI-PLC (Invitrogen) en TNE 0,2% Digitonina durante 1 h a 37 °C. Después del tratamiento enzimático se eliminaron las membranas por centrifugación a 17.000 g durante 1 h a 4 °C. Para la inmunoprecipitación de Gas1-GFP, el sobrenadante fue incubado con bolas GFP-Trap_A (ChromoTek) durante toda la noche a 4 °C. Las muestras purificadas de Gas1-GFP fueron sometidas a electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE), los cuales fueron teñidos con Coomassie Brilliant Blue. Las bandas teñidas correspondientes a Gas1-GFP se extrajeron del gel y, tras la alquilación con idoacetamida y la reducción con DTT, fueron digeridas con tripsina. Los péptidos obtenidos fueron extraídos, secados y resuspendidos en 20 µl de agua. Una parte (8 µl) fue inyectada en la LC (Cromatografía Líquida). Los péptidos fueron separados en una columna ODS (Develosil 300ODS-HG-5; 150 × 1.0 mm ID, Nomura Chemicals) bajo unas condiciones específicas de gradiente. Las fases móviles fueron; solvente A (0,08% ácido fórmico) y solvente B (0,15% ácido fórmico en 80% de acetonitrilo). La columna fue eluída con el solvente A durante 5 minutos, momento en el cual la concentración del solvente B fue aumentando hasta el 40% en 55 minutos con un flujo de 50 µl/min usando un sistema Accela-HPLC (Thermo Fisher Scientific). El eluído fue introducido de forma continua en una fuente ESI (Ionización por Electrospray) y los péptidos fueron analizados por LTQ Orbitrap XL (*hybrid linear ion trap-orbitrap mass spectrometer*; Thermo Fisher Scientific). Para los

ajustes del MS, el voltaje de la entrada a los capilares fue de 4,5 kV y la temperatura fue mantenida a 300 °C. El voltaje de los capilares y de las lentes tubulares fue de 15 V y 50 V, respectivamente. Los datos de MS fueron obtenidos en el modo de iones positivos en un rango de masa de m/z 300 a m/z 3000 (resolución: 60.000, precisión: 10 ppm).

6.5. Microscopía de fluorescencia

Para los experimentos de microscopía de fluorescencia de Gas1-GFP y Mid2-VENUS las células fueron cultivadas en medio YPD durante toda la noche, recolectadas por centrifugación, lavadas dos veces con PBS pH 7,4 e incubadas 15 minutos en hielo previa visualización al microscopio, tal y como se describe en (Rolli et al., 2009).

Para la visualización *in vivo* de los mutantes termosensibles *sec31-1*, los cuales expresan la construcción de Gas-GFP bajo el promotor *GAL1*, fueron crecidos toda la noche a 24 °C en YPR. Después de la inducción durante 1 hora a 24 °C en YPG, las células fueron incubadas a 37 °C durante 30 minutos en SG, tras lo cual se produjo la liberación del sistema gracias al cambio a temperatura permisiva (24 °C).

6.5.1. Fluorescencia convencional

La adquisición fue llevada a cabo usando el microscopio Leica DMi8 equipado con un objetivo (HCX PL APO 1003/1.40OIL PH3 CS), un filtro L5, cámara Hamamatsu y el software LASX (*Leica Application Suite X*) para la toma de imágenes.

6.5.2. *Super Resolution Confocal Live Image Microscopy (SCLIM)*

Para la toma de imágenes usando SCLIM las células fueron inmovilizadas en el portaobjetos usando concavalina A. El SCLIM fue desarrollado combinando un microscopio de fluorescencia invertido Olympus modelo IX-71 con una lente objetivo de inmersión en aceite UPlanSApo 100× NA 1.4 (Olympus), un escáner confocal *spinnind-*

MATERIALES Y MÉTODOS

disk de alta velocidad y alto ratio señal/ruido (Yokogawa Electric), una unidad espectroscópica de diseño propio, un intensificador de imagen (Hamamatsu Photonics) equipado con un sistema de refrigeración propio, un sistema de magnificación final de 266,7X y cámaras EM-CCM (Hamamatsu Photonics) (Kurokawa et al., 2013).

La adquisición de imágenes fue realizada gracias a un programa de desarrollo propio (Yokogawa Electric). Para la toma de imágenes en 3D se tomaron secciones ópticas con un espaciado de 100 nm. Las imágenes de *Z-stacks* fueron convertidas a volúmenes 3D y procesadas por deconvolución gracias al programa Volocity (Perkin Elmer) usando el PSF (*point-spread function*) teórico para los microscopios confocales con *spinning disk*. La cuantificación de los ERES que contenían cargo fue realizada por análisis de colocalización con el programa Volocity.

6.6. Análisis estadístico

La significancia estadística fue determinada usando la prueba *T de Student* (n.s. no significativo; * $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ y ***, $p < 0.001$). Se muestra la media y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes.

7. BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera-Romero, A., Kaminska, J., Spang, A., Riezman, H., & Muñiz, M. (2008). The yeast p24 complex is required for the formation of COPI retrograde transport vesicles from the Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 180(4), 713-720. <https://doi.org/10.1083/jcb.200710025>
- Aguilera-Romero, A., & Muñiz, M. (2021). A Role for Lipids in Protein Sorting? *Chimia (Aarau)*, 75(12), 1026-1030. <https://doi.org/10.2533/chimia.2021.1026>
- Alonso, A., & Goñi, F. M. (2018). The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annu Rev Biophys*, 47, 633-654. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033309>
- Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(11), a007526. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a007526>
- Barlowe, C., & Schekman, R. (1993). SEC12 encodes a guanine-nucleotide-exchange factor essential for transport vesicle budding from the ER. *Nature*, 365(6444), 347-349. <https://doi.org/10.1038/365347a0>
- Barlowe, C. K., & Miller, E. A. (2013). Secretory protein biogenesis and traffic in the early secretory pathway. *Genetics*, 193(2), 383-410. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.142810>
- Benachour, A., Sipos, G., Flury, I., Reggiori, F., Canivenc-Gansel, E., Vionnet, C., . . . Benghezal, M. (1999). Deletion of GPI7, a yeast gene required for addition of a side chain to the glycosylphosphatidylinositol (GPI) core structure, affects GPI protein transport, remodeling, and cell wall integrity. *J Biol Chem*, 274(21), 15251-15261. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15251>
- Bonifacino, J. S., & Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell*, 116(2), 153-166. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)01079-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01079-1)
- Bosson, R., Jaquenoud, M., & Conzelmann, A. (2006). GUP1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes an O-acyltransferase involved in remodeling of the GPI anchor. *Mol Biol Cell*, 17(6), 2636-2645. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-02-0104>
- Bretscher, M. S., & Munro, S. (1993). Cholesterol and the Golgi apparatus. *Science*, 261(5126), 1280-1281. <https://doi.org/10.1126/science.8362242>
- Brown, D. A., & Rose, J. K. (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68(3), 533-544. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90189-j](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90189-j)
- Brügger, B., Sandhoff, R., Wegehingel, S., Gorgas, K., Malsam, J., Helms, J. B., . . . Wieland, F. T. (2000). Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during

BIBLIOGRAFÍA

- formation of COPI-coated vesicles. *J Cell Biol*, 151(3), 507-518. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.3.507>
- Budnik, A., & Stephens, D. J. (2009). ER exit sites--localization and control of COPII vesicle formation. *FEBS Lett*, 583(23), 3796-3803. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.10.038>
- Carney, G. E., & Bowen, N. J. (2004). p24 proteins, intracellular trafficking, and behavior: *Drosophila melanogaster* provides insights and opportunities. *Biol Cell*, 96(4), 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.01.004>
- Castillon, G. A., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Epstein, S., Kajiwara, K., Funato, K., . . . Muñiz, M. (2011). The yeast p24 complex regulates GPI-anchored protein transport and quality control by monitoring anchor remodeling. *Mol Biol Cell*, 22(16), 2924-2936. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0294>
- Castillon, G. A., Watanabe, R., Taylor, M., Schwabe, T. M., & Riezman, H. (2009). Concentration of GPI-anchored proteins upon ER exit in yeast. *Traffic*, 10(2), 186-200. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2008.00857.x>
- Castro, B. M., Prieto, M., & Silva, L. C. (2014). Ceramide: a simple sphingolipid with unique biophysical properties. *Prog Lipid Res*, 54, 53-67. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.01.004>
- Chen, D. C., Yang, B. C., & Kuo, T. T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet*, 21(1), 83-84. <https://doi.org/10.1007/BF00318659>
- Contreras, F. X., Ernst, A. M., Haberkant, P., Björkholm, P., Lindahl, E., Gönen, B., . . . Brügger, B. (2012). Molecular recognition of a single sphingolipid species by a protein's transmembrane domain. *Nature*, 481(7382), 525-529. <https://doi.org/10.1038/nature10742>
- Copic, A., Latham, C. F., Horlbeck, M. A., D'Arcangelo, J. G., & Miller, E. A. (2012). ER cargo properties specify a requirement for COPII coat rigidity mediated by Sec13p. *Science*, 335(6074), 1359-1362. <https://doi.org/10.1126/science.1215909>
- D'Arcangelo, J. G., Stahmer, K. R., & Miller, E. A. (2013). Vesicle-mediated export from the ER: COPII coat function and regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1833(11), 2464-2472. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.003>
- De Craene, J. O., Coleman, J., Estrada de Martin, P., Pypaert, M., Anderson, S., Yates, J. R., 3rd, . . . Novick, P. (2006). Rtn1p is involved in structuring the cortical endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 17(7), 3009-3020. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-01-0080>

- Ellgaard, L., & Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4(3), 181-191. <https://doi.org/10.1038/nrm1052>
- Emr, S., Glick, B. S., Linstedt, A. D., Lippincott-Schwartz, J., Luini, A., Malhotra, V., . . . Wieland, F. T. (2009). Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. *J Cell Biol*, 187(4), 449-453. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909011>
- Ferguson, M. A. J., Kinoshita, T., & Hart, G. W. (2009). Glycosylphosphatidylinositol Anchors. In A. Varki, R. D. Cummings, J. D. Esko, H. H. Freeze, P. Stanley, C. R. Bertozzi, G. W. Hart, & M. E. Etzler (Eds.), *Essentials of Glycobiology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Copyright © 2009, The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California.
- Fujita, M., & Jigami, Y. (2008). Lipid remodeling of GPI-anchored proteins and its function. *Biochim Biophys Acta*, 1780(3), 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.08.009>
- Fujita, M., & Kinoshita, T. (2012). GPI-anchor remodeling: potential functions of GPI-anchors in intracellular trafficking and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta*, 1821(8), 1050-1058. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2012.01.004>
- Fujita, M., Maeda, Y., Ra, M., Yamaguchi, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009). GPI glycan remodeling by PGAP5 regulates transport of GPI-anchored proteins from the ER to the Golgi. *Cell*, 139(2), 352-365. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.040>
- Fujita, M., Umemura, M., Yoko-o, T., & Jigami, Y. (2006). PER1 is required for GPI-phospholipase A2 activity and involved in lipid remodeling of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell*, 17(12), 5253-5264. <https://doi.org/10.1091/mbc.e06-08-0715>
- Fujita, M., Yoko-O, T., & Jigami, Y. (2006). Inositol deacylation by Bst1p is required for the quality control of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *Mol Biol Cell*, 17(2), 834-850. <https://doi.org/10.1091/mbc.e05-05-0443>
- Funato, K., Riezman, H., & Muñoz, M. (2020). Vesicular and non-vesicular lipid export from the ER to the secretory pathway. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1865(1), 158453. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.04.013>
- Füllekrug, J., Sukanuma, T., Tang, B. L., Hong, W., Storrie, B., & Nilsson, T. (1999). Localization and recycling of gp27 (hp24gamma3): complex formation with other p24 family members. *Mol Biol Cell*, 10(6), 1939-1955. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.6.1939>
- Geva, Y., & Schuldiner, M. (2014). The back and forth of cargo exit from the endoplasmic reticulum. *Curr Biol*, 24(3), R130-136. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.12.008>

BIBLIOGRAFÍA

- Gietz, R. D., & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2(1), 31-34. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.13>
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 350, 87-96. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)50957-5)
- Glick, B. S., & Nakano, A. (2009). Membrane traffic within the Golgi apparatus. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 25, 113-132. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175421>
- Goñi, F. M., & Alonso, A. (2009). Effects of ceramide and other simple sphingolipids on membrane lateral structure. *Biochim Biophys Acta*, 1788(1), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.09.002>
- Harayama, T., & Riezman, H. (2018). Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(5), 281-296. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.138>
- Holthuis, J. C., & Menon, A. K. (2014). Lipid landscapes and pipelines in membrane homeostasis. *Nature*, 510(7503), 48-57. <https://doi.org/10.1038/nature13474>
- Holthuis, J. C., Pomorski, T., Riggers, R. J., Sprong, H., & Van Meer, G. (2001). The organizing potential of sphingolipids in intracellular membrane transport. *Physiol Rev*, 81(4), 1689-1723. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.4.1689>
- Horvath, A., Sütterlin, C., Manning-Krieg, U., Movva, N. R., & Riezman, H. (1994). Ceramide synthesis enhances transport of GPI-anchored proteins to the Golgi apparatus in yeast. *EMBO J*, 13(16), 3687-3695. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06678.x>
- Ikeda, A., Hanaoka, K., & Funato, K. (2021). Protocol for measuring sphingolipid metabolism in budding yeast. *STAR Protoc*, 2(2), 100412. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100412>
- Jiménez-Rojo, N., Leonetti, M. D., Zoni, V., Colom, A., Feng, S., Iyengar, N. R., . . . Riezman, H. (2020). Conserved Functions of Ether Lipids and Sphingolipids in the Early Secretory Pathway. *Curr Biol*, 30(19), 3775-3787.e3777. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.07.059>
- Kajiwara, K., Watanabe, R., Pichler, H., Ihara, K., Murakami, S., Riezman, H., & Funato, K. (2008). Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*, 19(5), 2069-2082. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-08-0740>

- Kanzawa, N., Maeda, Y., Ogiso, H., Murakami, Y., Taguchi, R., & Kinoshita, T. (2009). Peroxisome dependency of alkyl-containing GPI-anchor biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42), 17711-17716. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904762106>
- Kinoshita, T. (2020). Biosynthesis and biology of mammalian GPI-anchored proteins. *Open Biol*, 10(3), 190290. <https://doi.org/10.1098/rsob.190290>
- Kinoshita, T., & Fujita, M. (2016). Biosynthesis of GPI-anchored proteins: special emphasis on GPI lipid remodeling. *J Lipid Res*, 57(1), 6-24. <https://doi.org/10.1194/jlr.R063313>
- Klemm, R. W., Ejsing, C. S., Surma, M. A., Kaiser, H. J., Gerl, M. J., Sampaio, J. L., . . . Simons, K. (2009). Segregation of sphingolipids and sterols during formation of secretory vesicles at the trans-Golgi network. *J Cell Biol*, 185(4), 601-612. <https://doi.org/10.1083/jcb.200901145>
- Kung, L. F., Pagant, S., Futai, E., D'Arcangelo, J. G., Buchanan, R., Dittmar, J. C., . . . Miller, E. A. (2012). Sec24p and Sec16p cooperate to regulate the GTP cycle of the COPII coat. *Embo j*, 31(4), 1014-1027. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.444>
- Kurokawa, K., Ishii, M., Suda, Y., Ichihara, A., & Nakano, A. (2013). Live cell visualization of Golgi membrane dynamics by super-resolution confocal live imaging microscopy. *Methods Cell Biol*, 118, 235-242. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417164-0.00014-8>
- Kurokawa, K., & Nakano, A. (2019). The ER exit sites are specialized ER zones for the transport of cargo proteins from the ER to the Golgi apparatus. *J Biochem*, 165(2), 109-114. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy080>
- Lebreton, S., Zurzolo, C., & Paladino, S. (2018). Organization of GPI-anchored proteins at the cell surface and its physiopathological relevance. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 53(4), 403-419. <https://doi.org/10.1080/10409238.2018.1485627>
- Lee, M. C., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L., & Schekman, R. (2004). Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 87-123. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.105307>
- Lee, M. C., Orci, L., Hamamoto, S., Futai, E., Ravazzola, M., & Schekman, R. (2005). Sar1p N-terminal helix initiates membrane curvature and completes the fission of a COPII vesicle. *Cell*, 122(4), 605-617. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.07.025>
- Levental, I., & Veatch, S. (2016). The Continuing Mystery of Lipid Rafts. *J Mol Biol*, 428(24 Pt A), 4749-4764. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.022>

BIBLIOGRAFÍA

- Li, J., Mouyna, I., Henry, C., Moyrand, F., Malosse, C., Chamot-Rooke, J., . . . Fontaine, T. (2018). Glycosylphosphatidylinositol Anchors from Galactomannan and GPI-Anchored Protein Are Synthesized by Distinct Pathways in *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi (Basel)*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/jof4010019>
- Liu, L. K., Choudhary, V., Toulmay, A., & Prinz, W. A. (2017). An inducible ER-Golgi tether facilitates ceramide transport to alleviate lipotoxicity. *J Cell Biol*, 216(1), 131-147. <https://doi.org/10.1083/jcb.201606059>
- Loizides-Mangold, U., David, F. P., Nesatyy, V. J., Kinoshita, T., & Riezman, H. (2012). Glycosylphosphatidylinositol anchors regulate glycosphingolipid levels. *J Lipid Res*, 53(8), 1522-1534. <https://doi.org/10.1194/jlr.M025692>
- Lopez, S., Rodriguez-Gallardo, S., Sabido-Bozo, S., & Muñiz, M. (2019). Endoplasmic Reticulum Export of GPI-Anchored Proteins. *Int J Mol Sci*, 20(14). <https://doi.org/10.3390/ijms20143506>
- Losev, E., Reinke, C. A., Jellen, J., Strongin, D. E., Bevis, B. J., & Glick, B. S. (2006). Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature*, 441(7096), 1002-1006. <https://doi.org/10.1038/nature04717>
- Manzano-Lopez, J., Perez-Linero, A. M., Aguilera-Romero, A., Martin, M. E., Okano, T., Silva, D. V., . . . Muñiz, M. (2015). COPII coat composition is actively regulated by luminal cargo maturation. *Curr Biol*, 25(2), 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.11.039>
- Marzioch, M., Henthorn, D. C., Herrmann, J. M., Wilson, R., Thomas, D. Y., Bergeron, J. J., . . . Rowley, A. (1999). Erp1p and Erp2p, partners for Emp24p and Erv25p in a yeast p24 complex. *Mol Biol Cell*, 10(6), 1923-1938. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.6.1923>
- Mayor, S., & Riezman, H. (2004). Sorting GPI-anchored proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 110-120. <https://doi.org/10.1038/nrm1309>
- Mays, R. W., Siemers, K. A., Fritz, B. A., Lowe, A. W., van Meer, G., & Nelson, W. J. (1995). Hierarchy of mechanisms involved in generating Na/K-ATPase polarity in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol*, 130(5), 1105-1115. <https://doi.org/10.1083/jcb.130.5.1105>
- Melero, A., Chiaruttini, N., Karashima, T., Riezman, I., Funato, K., Barlowe, C., . . . Roux, A. (2018). Lysophospholipids Facilitate COPII Vesicle Formation. *Curr Biol*, 28(12), 1950-1958.e1956. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.04.076>
- Miller, E. A., Beilharz, T. H., Malkus, P. N., Lee, M. C., Hamamoto, S., Orci, L., & Schekman, R. (2003). Multiple cargo binding sites on the COPII subunit Sec24p ensure

- capture of diverse membrane proteins into transport vesicles. *Cell*, 114(4), 497-509. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00609-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00609-3)
- Muñiz, M., Morsomme, P., & Riezman, H. (2001). Protein sorting upon exit from the endoplasmic reticulum. *Cell*, 104(2), 313-320. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00215-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00215-x)
- Muñiz, M., & Riezman, H. (2000). Intracellular transport of GPI-anchored proteins. *EMBO J*, 19(1), 10-15. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.1.10>
- Muñiz, M., & Riezman, H. (2016). Trafficking of glycosylphosphatidylinositol anchored proteins from the endoplasmic reticulum to the cell surface. *J Lipid Res*, 57(3), 352-360. <https://doi.org/10.1194/jlr.R062760>
- Muñiz, M., & Zurzolo, C. (2014). Sorting of GPI-anchored proteins from yeast to mammals--common pathways at different sites? *J Cell Sci*, 127(Pt 13), 2793-2801. <https://doi.org/10.1242/jcs.148056>
- Okamoto, M., Kurokawa, K., Matsuura-Tokita, K., Saito, C., Hirata, R., & Nakano, A. (2012). High-curvature domains of the ER are important for the organization of ER exit sites in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 125(Pt 14), 3412-3420. <https://doi.org/10.1242/jcs.100065>
- Olson, D. K., Fröhlich, F., Farese, R. V., & Walther, T. C. (2016). Taming the sphinx: Mechanisms of cellular sphingolipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta*, 1861(8 Pt B), 784-792. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2015.12.021>
- Orlean, P., & Menon, A. K. (2007). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. GPI anchoring of protein in yeast and mammalian cells, or: how we learned to stop worrying and love glycopospholipids. *J Lipid Res*, 48(5), 993-1011. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700002-JLR200>
- Paladino, S., Sarnataro, D., Pillich, R., Tivodar, S., Nitsch, L., & Zurzolo, C. (2004). Protein oligomerization modulates raft partitioning and apical sorting of GPI-anchored proteins. *J Cell Biol*, 167(4), 699-709. <https://doi.org/10.1083/jcb.200407094>
- Pastor-Cantizano, N., Montesinos, J. C., Bernat-Silvestre, C., Marcote, M. J., & Aniento, F. (2016). p24 family proteins: key players in the regulation of trafficking along the secretory pathway. *Protoplasma*, 253(4), 967-985. <https://doi.org/10.1007/s00709-015-0858-6>
- Pike, L. J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipid Rafts and Cell Function. In *J Lipid Res* (Vol. 47, pp. 1597-1598). <https://doi.org/10.1194/jlr.E600002-JLR200>

BIBLIOGRAFÍA

- Pinto, S. N., Silva, L. C., Futerman, A. H., & Prieto, M. (2011). Effect of ceramide structure on membrane biophysical properties: the role of acyl chain length and unsaturation. *Biochim Biophys Acta*, 1808(11), 2753-2760. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.023>
- Pittet, M., & Conzelmann, A. (2007). Biosynthesis and function of GPI proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, 1771(3), 405-420. <https://doi.org/10.1016/j.bbaliip.2006.05.015>
- Prasad, R., Sliwa-Gonzalez, A., & Barral, Y. (2020). Mapping bilayer thickness in the ER membrane. *Sci Adv*, 6(46). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba5130>
- Raghupathy, R., Anilkumar, A. A., Polley, A., Singh, P. P., Yadav, M., Johnson, C., . . . Mayor, S. (2015). Transbilayer lipid interactions mediate nanoclustering of lipid-anchored proteins. *Cell*, 161(3), 581-594. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.048>
- Rodriguez-Gallardo, S., Kurokawa, K., Sabido-Bozo, S., Cortes-Gomez, A., Ikeda, A., Zoni, V., . . . Muñiz, M. (2020). Ceramide chain length-dependent protein sorting into selective endoplasmic reticulum exit sites. *Sci Adv*, 6(50). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8237>
- Rodriguez-Gallardo, S., Sabido-Bozo, S., Ikeda, A., Araki, M., Okazaki, K., Nakano, M., . . . Funato, K. (2022). Quality-controlled ceramide-based GPI-anchored protein sorting into selective ER exit sites. *Cell Rep*, 39(5), 110768. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110768>
- Rolli, E., Ragni, E., Calderon, J., Porello, S., Fascio, U., & Popolo, L. (2009). Immobilization of the glycosylphosphatidylinositol-anchored Gas1 protein into the chitin ring and septum is required for proper morphogenesis in yeast. *Mol Biol Cell*, 20(22), 4856-4870. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1155>
- Sabido-Bozo, S., Perez-Linero, A. M., Manzano-Lopez, J., Rodriguez-Gallardo, S., Aguilera-Romero, A., Cortes-Gomez, A., . . . Muñiz, M. (2021). The p24 Complex Contributes to Specify Arf1 for COPI Coat Selection. *Int J Mol Sci*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/ijms22010423>
- Sambrook, J. a. R., D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd Edition ed., Vol. Vol. 1). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sato, K., & Nakano, A. (2005). Dissection of COPII subunit-cargo assembly and disassembly kinetics during Sar1p-GTP hydrolysis. *Nat Struct Mol Biol*, 12(2), 167-174. <https://doi.org/10.1038/nsmb893>
- Satpute-Krishnan, P., Ajinkya, M., Bhat, S., Itakura, E., Hegde, R. S., & Lippincott-Schwartz, J. (2014). ER stress-induced clearance of misfolded GPI-anchored

- proteins via the secretory pathway. *Cell*, 158(3), 522-533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.06.026>
- Schuck, S., Honsho, M., Ekroos, K., Shevchenko, A., & Simons, K. (2003). Resistance of cell membranes to different detergents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(10), 5795-5800. <https://doi.org/10.1073/pnas.0631579100>
- Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., & Eggeling, C. (2017). The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18(6), 361-374. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.16>
- Sharpe, H. J., Stevens, T. J., & Munro, S. (2010). A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties. *Cell*, 142(1), 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.037>
- Shimoni, Y., Kurihara, T., Ravazzola, M., Amherdt, M., Orci, L., & Schekman, R. (2000). Lst1p and Sec24p cooperate in sorting of the plasma membrane ATPase into COPII vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 151(5), 973-984. <https://doi.org/10.1083/jcb.151.5.973>
- Shindiapina, P., & Barlowe, C. (2010). Requirements for transitional endoplasmic reticulum site structure and function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 21(9), 1530-1545. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-07-0605>
- Sikorska, N., Lemus, L., Aguilera-Romero, A., Manzano-Lopez, J., Riezman, H., Muñoz, M., & Goder, V. (2016). Limited ER quality control for GPI-anchored proteins. *J Cell Biol*, 213(6), 693-704. <https://doi.org/10.1083/jcb.201602010>
- Silva, L., de Almeida, R. F., Fedorov, A., Matos, A. P., & Prieto, M. (2006). Ceramide-platform formation and -induced biophysical changes in a fluid phospholipid membrane. *Mol Membr Biol*, 23(2), 137-148. <https://doi.org/10.1080/09687860500439474>
- Simons, K., & Ikonen, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature*, 387(6633), 569-572. <https://doi.org/10.1038/42408>
- Simons, K., & Sampaio, J. L. (2011). Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3(10), a004697. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004697>
- Smith, M. H., Ploegh, H. L., & Weissman, J. S. (2011). Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334(6059), 1086-1090. <https://doi.org/10.1126/science.1209235>

BIBLIOGRAFÍA

- Sot, J., Bagatolli, L. A., Goñi, F. M., & Alonso, A. (2006). Detergent-resistant, ceramide-enriched domains in sphingomyelin/ceramide bilayers. *Biophys J*, *90*(3), 903-914. <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.067710>
- Stachowiak, J. C., Brodsky, F. M., & Miller, E. A. (2013). A cost-benefit analysis of the physical mechanisms of membrane curvature. *Nat Cell Biol*, *15*(9), 1019-1027. <https://doi.org/10.1038/ncb2832>
- Strating, J. R., & Martens, G. J. (2009). The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol Cell*, *101*(9), 495-509. <https://doi.org/10.1042/bc20080233>
- Sütterlin, C., Doering, T. L., Schimmöller, F., Schröder, S., & Riezman, H. (1997). Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J Cell Sci*, *110* (Pt 21), 2703-2714.
- Tanaka, S., Maeda, Y., Tashima, Y., & Kinoshita, T. (2004). Inositol deacylation of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins is mediated by mammalian PGAP1 and yeast Bst1p. *J Biol Chem*, *279*(14), 14256-14263. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313755200>
- Tashima, Y., Hirata, T., Maeda, Y., Murakami, Y., & Kinoshita, T. (2022). Differential use of p24 family members as cargo receptors for the transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and Wnt1. *J Biochem*, *171*(1), 75-83. <https://doi.org/10.1093/jb/mvab108>
- Thor, F., Gautschi, M., Geiger, R., & Helenius, A. (2009). Bulk flow revisited: transport of a soluble protein in the secretory pathway. *Traffic*, *10*(12), 1819-1830. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2009.00989.x>
- Umemura, M., Fujita, M., Yoko-O, T., Fukamizu, A., & Jigami, Y. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* CWH43 is involved in the remodeling of the lipid moiety of GPI anchors to ceramides. *Mol Biol Cell*, *18*(11), 4304-4316. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0482>
- van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *9*(2), 112-124. <https://doi.org/10.1038/nrm2330>
- Vazquez, H. M., Vionnet, C., Roubaty, C., & Conzelmann, A. (2014). Cdc1 removes the ethanolamine phosphate of the first mannose of GPI anchors and thereby facilitates the integration of GPI proteins into the yeast cell wall. *Mol Biol Cell*, *25*(21), 3375-3388. <https://doi.org/10.1091/mbc.F14-06-1033>

- Veiga, M. P., Arrondo, J. L., Goñi, F. M., & Alonso, A. (1999). Ceramides in phospholipid membranes: effects on bilayer stability and transition to nonlamellar phases. *Biophys J*, 76(1 Pt 1), 342-350. [https://doi.org/10.1016/s0006-3495\(99\)77201-2](https://doi.org/10.1016/s0006-3495(99)77201-2)
- Ventura, A. E., Varela, A. R. P., Dingjan, T., Santos, T. C. B., Fedorov, A., Futerman, A. H., . . . Silva, L. C. (2020). Lipid domain formation and membrane shaping by C24-ceramide. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862(10), 183400. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183400>
- Voeltz, G. K., Prinz, W. A., Shibata, Y., Rist, J. M., & Rapoport, T. A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell*, 124(3), 573-586. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.047>
- Yang, G., & Banfield, D. K. (2020). Cdc1p is a Golgi-localized Glycosylphosphatidylinositol-anchored Protein Remodelase. *Mol Biol Cell*, mbcE20080539. <https://doi.org/10.1091/mbc.E20-08-0539>
- Yoko-O, T., Ichikawa, D., Miyagishi, Y., Kato, A., Umemura, M., Takase, K., . . . Jigami, Y. (2013). Determination and physiological roles of the glycosylphosphatidylinositol lipid remodelling pathway in yeast. *Mol Microbiol*, 88(1), 140-155. <https://doi.org/10.1111/mmi.12175>
- Yoko-O, T., Umemura, M., Komatsuzaki, A., Ikeda, K., Ichikawa, D., Takase, K., . . . Jigami, Y. (2018). Lipid moiety of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins contributes to the determination of their final destination in yeast. *Genes Cells*, 23(10), 880-892. <https://doi.org/10.1111/gtc.12636>
- Yorimitsu, T., & Sato, K. (2012). Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Mol Biol Cell*, 23(15), 2930-2942. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-05-0356>
- Zelnik, I. D., Ventura, A. E., Kim, J. L., Silva, L. C., & Futerman, A. H. (2020). The role of ceramide in regulating endoplasmic reticulum function. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1865(1), 158489. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2019.06.015>

BIBLIOGRAFÍA