



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Universidad Politécnica de Valencia

(Departamento de Biotecnología)

Centro de Investigación Príncipe Felipe

REGULACIÓN DE LA
DEGRADACIÓN INTRACELULAR
DE PROTEÍNAS POR GLUCOSA

Tesis doctoral presentada por:
José Félix Moruno Manchón

Dirigida por:
Dr. Erwin Knecht Roberto
Dra. Eva Pérez Jiménez

RESUMEN

La supervivencia celular frente a los cambios ambientales requiere el mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de proteínas. La degradación de proteínas, además de regular diferentes procesos celulares, tiene como función principal la eliminación de productos que no son útiles para la célula en determinadas situaciones o cuya acumulación puede ser tóxica. Los productos de esta degradación, es decir los aminoácidos, son reutilizados para la síntesis de nuevas moléculas o son metabolizados para la obtención de energía. La alteración de esta proteólisis intracelular puede llevar a la acumulación en el citoplasma de orgánulos defectuosos o de moléculas que se pueden agrupar en agregados insolubles y que pueden así desencadenar diferentes patologías. Aunque se ha avanzado bastante durante los últimos años en los conocimientos sobre la degradación intracelular de proteínas y de sus principales mecanismos, existen bastantes detalles moleculares todavía desconocidos. Por este motivo es necesario aportar nueva información sobre estos procesos que además podría ser relevante para identificar nuevas dianas terapéuticas y desarrollar tratamientos más eficaces para las enfermedades derivadas de alteraciones en los mismos.

La degradación de proteínas ocurre por diferentes mecanismos que pueden clasificarse generalmente en dependientes o no de unos orgánulos citoplásmicos, los lisosomas. La macroautofagia (a la que se denomina generalmente con el término más simple de autofagia) y el sistema ubiquitina-proteasomas son, respectivamente, los más importantes de esos dos grupos. Básicamente, el sistema ubiquitina-proteasomas consiste en la poliubiquitinación de proteínas que son después degradadas por los proteasomas. La autofagia en cambio se inicia con el secuestro de porciones del citoplasma en estructuras de doble membrana que se cierran formando los autofagosomas. Posteriormente, los autofagosomas se fusionan con endosomas y con lisosomas dando lugar a los autolisosomas, en los que por la acción de las proteasas o catepsinas lisosomales se degrada el material encerrado.

La autofagia está regulada por una amplia variedad de vías de señalización que responden a multitud de factores ambientales. Entre estos últimos, la situación de ayuno de nutrientes es la inductora más potente de la autofagia. Durante la privación de nutrientes como los aminoácidos, la célula sufre un estrés energético que debe tratar de reducir produciendo ATP a partir de nuevas fuentes. Para ello activa la autofagia para degradar los componentes de la célula, como las proteínas, hasta producir sus unidades básicas que después son metabolizadas. Por el contrario, se ha demostrado que cuando se proporcionan aminoácidos a la célula la autofagia es inhibida. Aunque el efecto sobre la autofagia de los aminoácidos ha sido estudiado ampliamente

en muchos laboratorios, no estaba tan claro ese efecto en el caso de otro nutriente, la glucosa, ya que cuando planteamos ese estudio los datos eran contradictorios.

En este trabajo hemos podido establecer claramente que la glucosa tiene un papel inductor sobre la autofagia empleando técnicas muy variadas que incluyen: la cuantificación por “Western-blot” de los niveles del marcador de autofagia LC3-II en presencia o en ausencia de inhibidores lisosomales, la cuantificación de la proteína degradada, total y por la vía autofágica, mediante experimentos de pulso y caza, la cuantificación morfométrica de estructuras autofágicas (equivalentes a autofagosomas y autolisosomas) por microscopia electrónica y la cuantificación de la masa lisosomal por fluorescencia. Además, hemos comprobado que la glucosa también induce la ubiquitinación de proteínas y la degradación de estas por los proteasomas. Con estos y otros datos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral, hemos podido concluir que la glucosa induce la autofagia en todos los tipos celulares estudiados y en todas las condiciones ensayadas. Este efecto disminuye o se enmascara cuando están presentes a la vez otros factores que son inhibidores de la autofagia, como los aminoácidos o el suero bovino fetal, lo que podría explicar algunos de los datos contradictorios en la literatura.

La glucosa aporta la energía necesaria para el correcto funcionamiento de la autofagia a partir de unos niveles mínimos de ATP. Un descenso en la disponibilidad energética a través de la inhibición de la glucólisis reprime la autofagia inducida por la glucosa. Sin embargo, la estimulación de la autofagia por glucosa no parece depender únicamente de la disponibilidad de ATP, sino que hemos identificado una vía de señalización en la que no interviene AMPK a pesar de responder al descenso de los niveles de ATP y al aumento de los niveles de calcio durante la incubación en un medio carente de glucosa. Esta vía tampoco implica a mTORC1 y en ella sí interviene en cambio la MAPK p38 α , como hemos comprobado con diferentes inhibidores de esta quinasa, con el uso de siRNAs o empleando MEFs *p38*^{-/-}. Consideramos que estos resultados contribuyen a clarificar más la regulación de la autofagia por nutrientes y, más concretamente, por uno tan relevante como es la glucosa.

RESUM

La supervivència cel·lular front als canvis ambientals requereix el manteniment d'un equilibri dinàmic entre la síntesi i la degradació de proteïnes. La degradació de proteïnes, a més de regular diferents processos cel·lulars, té com a funció principal l'eliminació de productes que no són útils per a la cèl·lula en determinades situacions o l'acumulació dels quals pot ser tòxica. Els productes d'aquesta degradació, és a dir els aminoàcids, són reutilitzats per a la síntesi de noves molècules o són metabolitzats per a l'obtenció d'energia. L'alteració d'aquesta proteólisis intracel·lular pot portar a l'acumulació en el citoplasma d'orgànuls defectuosos o de molècules que es poden agrupar en agregats insolubles i que poden desencadenar diferents patologies. Encara que s'ha avançat suficient durant els últims anys en els coneixements sobre la degradació intracel·lular de proteïnes i dels seus principals mecanismes, existeixen prou detalls moleculars encara desconeguts. Per aquest motiu, és necessari aportar nova informació sobre els processos que a més podria ser rellevant per a identificar noves dianes terapèutiques i desenvolupar tractaments més eficaços per a les malalties derivades de les alteracions en els mateixos.

La degradació de proteïnes es produeix mitjançant diferents processos que poden classificar-se generalment en mecanismes dependents o no d'uns orgànuls citoplasmàtics, els lisosomes. La macroautofàgia (a la qual es denomina generalment amb el terme més simple d'autofàgia) i el sistema ubiquitina-proteasomes són, respectivament, els més importants d'eixos dos grups. Bàsicament, el sistema ubiquitina-proteasomes consisteix en la poliubiquitinació de proteïnes que són després degradades pels proteasomes. L'autofàgia en canvi s'inicia amb el segrest de porcions del citoplasma en estructures de doble membrana que es tanquen formant els autofagosomes. Posteriorment, els autofagosomes es fusionen amb endosomes i amb lisosomes donant lloc als autolisosomes en els quals per l'acció de les proteases o catepsines lisosomals es degrada el material tancat.

L'autofàgia està regulada per una àmplia varietat de vies de senyalització que responen a multitud de factors ambientals. Entre aquests últims, la situació de dejuni de nutrients és la inductora més potent de l'autofàgia. Durant la privació de nutrients com els aminoàcids, la cèl·lula pateix un estrès energètic que ha de tractar de reduir produint ATP a partir de noves fonts. Per això activa l'autofàgia per a degradar els components de la cèl·lula com les proteïnes, fins produir les seues unitats bàsiques que després són metabolitzades. Al contrari, s'ha demostrat que quan es proporcionen aminoàcids a la cèl·lula l'autofàgia és inhibida. Encara que l'efecte sobre l'autofàgia dels aminoàcids ha sigut estudiat àmpliament en molts laboratoris, no

estava tan clar eixe efecte en el cas d'un altre nutrient, la glucosa, ja que quan nosaltres plantegem eixe estudi les dades eren contradictòries.

En aquest treball hem pogut establir clarament que la glucosa té un paper inductor de l'autofàgia emprant tècniques molt variades que inclouen: la quantificació per "Western-blot" dels nivells del marcador d'autofàgia LC3-II en presència o en absència d'inhibidors lisosomals, la quantificació de la proteïna degradada, total i per la via autofàgica, mitjançant experiments de pols i caça, la quantificació morfològica d'estructures autofàgiques per microscòpia electrònica i la quantificació de la massa lisosomal per fluorescència. A més, hem comprovat que la glucosa també induïx l'ubiquitinació de proteïnes i la degradació d'aquestes pels proteasomes. Amb aquestes i altres dades obtingudes durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, hem pogut concloure que la glucosa induïx l'autofàgia en tots els tipus cel·lulars estudiats i en totes les condicions assajades. Aquest efecte disminueix o s'emmascara quan estan presents al mateix temps altres factors que són inhibidors de l'autofàgia com els aminoàcids o el sèrum boví fetal, cosa que podria explicar algunes de les dades contradictòries en la literatura.

La glucosa aporta l'energia necessària per al correcte funcionament de l'autofàgia a partir d'uns nivells mínims d'ATP. Un descens en la disponibilitat energètica mitjançant la inhibició de la glucòlisi reprimeix l'autofàgia induïda per la glucosa. No obstant això, l'estimulació de l'autofàgia per glucosa no pareix dependre únicament de la disponibilitat d'ATP, sinó que hem identificat una via de senyalització en què no intervé AMPK tot i respondre al descens dels nivells d'ATP i a l'augment dels nivells de calci durant la incubació en un medi mancat de glucosa. Aquesta via tampoc implica a mTORC1 i en ella sí intervé en canvi la MAPK p38 α , com hem comprovat amb diferents inhibidors d'aquesta quinasa, amb la utilització de siRNAs o emprant MEFs *p38*^{-/-}. Considerem que aquestos resultats contribueixen a clarificar més la regulació de l'autofàgia per nutrients i, més concretament, per un tan rellevant com és la glucosa.

ABSTRACT

Cell survival in response to environmental changes requires the maintenance of a dynamic equilibrium between protein synthesis and degradation. The main function of protein degradation, apart of regulating different cellular processes, is the removal of useless products or products which accumulation may be toxic to the cell. The amino acids resulting from this degradation are reused for the synthesis of new molecules or are otherwise metabolized for energy obtaining. Alteration of intracellular proteolysis can produce the accumulation of defective organelles or proteins (or other molecules) that can accumulate in insoluble aggregates what can lead to the development of different pathologies. During the last years there has been a great advance in the knowledge about intracellular degradation of proteins and their main mechanisms. However, a lot of molecular details are still unknown. It is therefore necessary to shed new light on these processes that could be of relevance to identify new therapeutic targets and to develop more effective treatments for diseases resulting from alterations in them.

Protein degradation can occur by different mechanisms that can be classified based on the involvement of lysosomes. Among them, macroautophagy (usually referred to as autophagy) and the ubiquitin-proteasome system are the most important. In essence, the ubiquitin-proteasome system consists in the polyubiquitination of proteins that are subsequently degraded in the proteasomes. Autophagy, on the contrary, consists in the sequestration of cytoplasmic portions by double membrane structures that will close forming an autophagosome that will ultimately fuse with endosomes and lysosomes forming autolysosomes. Is inside these structures where the engulfed material is degraded by the lysosomal proteases and cathepsins.

Autophagy is regulated by a wide variety of signaling transduction pathways that are activated in response to different environmental factors. Among them, nutrient starvation is the most potent inducer of autophagy. During nutrient deprivation, such as of amino acids, the cell is subjected to an energetic stress that will try to overcome by producing ATP from new sources. To this purpose, autophagy is activated in order to degrade cellular components, such as proteins, into its monomers that will be then metabolized. On the other hand, it has been repeatedly demonstrated that when amino acids are available, autophagy is inhibited. Although the effect of amino acids on autophagy has been extensively studied in many laboratories, the effect of glucose was not clear when we aborded this study and data were controversial.

In this work, we have clearly established that glucose is an inducer of autophagy by using different techniques such as quantification of LC3-II levels, as a marker of autophagy, by

Western-blot in the presence or absence of lysosomal inhibitors, quantification of the total amount of protein degraded and its percentage due to autophagy by pulse-chase experiments, morphometric quantification of autophagic structures (similar to autophagosomes and autolysosomes) by electron microscopy and quantification of the lysosomal mass by fluorescence. We have also observed that, in addition to autophagy, glucose induces the ubiquitination of proteins and their degradation in the proteasomes. Our data clearly demonstrate that glucose induces autophagy in all cell types analyzed and in all conditions tested. This effect is diminished when other factors are present, such as amino acids or fetal bovine serum, what could explain part of the contradictory data found in the literature.

Glucose provides the energy needed for the proper functioning of autophagy that will take place when a minimum threshold of ATP is reached. A drop in the energy availability caused by glycolysis inhibition blocks the autophagy induced by glucose. However, autophagy induction by glucose is not only due to the ATP provided. Although AMPK is phosphorylated in response to the decrease in ATP levels and the increase in calcium during glucose deprivation, it does not participate in the induction of autophagy by glucose, as well as mTOR. We have identified MAPK p38 α as the kinase responsible for the induction of autophagy by glucose, as assessed by the use of chemical inhibitors and by the use of RNA interference and knockout MEFs. We consider that these results contribute to clarify the regulation of autophagy by nutrients and, specifically, by glucose.

AGRADECIMIENTOS

Soy consciente de que el desarrollo de la presente tesis ha sido gracias a un gran número de personas y, sin duda, este es el mejor momento para agradecer sinceramente a todas y a cada una de ellas el que hayan dedicado parte de su tiempo a enseñarme y a guiarme a lo largo de este proyecto.

En primer lugar, agradezco al Dr. Erwin Knecht, mi director de tesis, que me aceptase en su laboratorio y que confiase en mí para desempeñar el proyecto que me encomendó. Recuerdo perfectamente el primer día que entré en su laboratorio. A principios de octubre de hace seis años visité el Centro de Investigación Príncipe Felipe para una entrevista de trabajo en el laboratorio de Biología Celular. Nuria me acompañó desde Recepción hasta un despacho donde me esperaba la Dra. Carmen Aguado. La entrevista duró unos cinco minutos y básicamente Carmen me hizo dos preguntas. La primera fue si había trabajado anteriormente en un laboratorio. Acababa de obtener lo que se llamaba DEA por mi trabajo en el Jardín Botánico de la Universidad de Valencia con las Dras. Pilar Soriano y Elena Estrelles y en el departamento de Biotecnología del IBMCP de la Universidad Politécnica de Valencia con el Dr. Oscar Vicente, ahora mi tutor. Así que respondí que sí. La segunda pregunta fue si sabía lo que era un laboratorio. Sin saber qué decir miré a mi alrededor y vi un lugar con largas bancadas ocupadas por centrífugas, balanzas y micropipetas, cajas apiladas sobre las neveras y un continuo trasiego de personas por todo el laboratorio. En aquel momento supuse que aquello sería la respuesta. Después de seis años sé que un laboratorio no es solo un local con un montón de material científico, sino también las personas que forman parte de ese laboratorio. Desde aquel día he visto que cada uno de los miembros del grupo del Dr. Knecht destaca principalmente por una cualidad necesaria para la ciencia y que la unión de todos ellos define el estilo de trabajo propio de Erwin. Por ejemplo, destaca el carácter y la precisión de Asunción, la pulcritud de Juan, la polivalencia de Eva, la organización de Carmen, el esfuerzo de Rita y la autocrítica de Ali, entre otros. Así, tener la suerte de haberme desarrollado personal y científicamente rodeado de tales cualidades es un motivo más para estar agradecido a Erwin. Además, me siento muy orgulloso de haber tenido como jefe a una persona que es responsable en todos los aspectos, como puede serlo con el dinero público hasta el último euro, con la situación laboral y familiar de cada componente del equipo (incluso después de abandonar el laboratorio) y con la política de gestión de su lugar de trabajo, siempre manteniéndose correcto al cuidar hasta el mínimo detalle, tanto en lo que se dice como en lo que se escribe.

Mis agradecimientos también van dirigidos a todos mis compañeros (Ali, Inma, Jaime, José, Juan, Rajaa y Rita) que han fomentado un ambiente de trabajo en equilibrio con la seriedad y el buen humor. Sobre todo quiero destacar mis agradecimientos a Carmen por confiar en mí desde el principio y por enseñarme la importancia de la organización del trabajo en un laboratorio. A Eva por su decisiva aportación a esta tesis como codirectora y como inmejorable compañera, por su creatividad y su entusiasmo por el trabajo y la vida, así como a Asunción por su permanente ayuda en el laboratorio y por su incondicional compromiso con todos los compañeros en su labor de miembro del Comité de Empresa.

No me olvido de la Dra. M^a Eugenia Armengod por ayudarme como si hubiese sido de su grupo, ni de los compañeros del laboratorio vecino de Genética Humana (Alfonso, Ana, Carmen, Elvira, Ismaïl, Magda, M^a José, Salva, Silvia...) por compartir su equipamiento y por echarnos de vez en cuando unas revitalizantes risas.

Del mismo modo dedico mis agradecimientos a las nuevas incorporaciones (Maripaz, Marcos y María) y a los diferentes estudiantes estadounidenses que anualmente hemos recibido en el laboratorio (Justin, Amanda...) por haber aportado una valiosa frescura al trabajo diario en el laboratorio.

Por otra parte, una tesis no se desarrolla únicamente con un director y los compañeros, sino que existe una complicada estructura burocrática que aún no he logrado entender completamente. Así que también doy las gracias a las entidades que han financiado los diferentes proyectos en los que se ha desarrollado la tesis (Ministerio de Ciencia e Innovación, la Generalitat Valenciana y la Fundació La Marató de TV3). También quiero incluir en este apartado al personal administrativo de la Unidad de Doctorado y del departamento de Biotecnología de la UPV que aunque hayamos mantenido un contacto por e-mail y por teléfono he apreciado la profesionalidad de cada uno de ellos.

Finalmente, doy millones de gracias a mis padres que confían en mí mucho más de lo que yo confío en mí mismo. A mi hermano por mantener nuestra complicidad y por mostrarme que es mejor reírse de uno mismo que tomarse en serio. Y a Pilar por darme la fuerza que necesitaba para que yo empezara el camino que realmente quería y por acompañarme y apoyarme de tal forma que ha hecho que este recorrido haya sido tan emocionante.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	2
1.1.	ASPECTOS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS.....	2
1.1.1.	EL SISTEMA UBICUITINA-PROTEASOMAS.....	7
1.1.2.	MACROAUTOFAGIA.....	13
1.2.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA.....	16
1.2.1.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR NUTRIENTES.....	16
1.2.2.	REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA	18
1.2.2.1.	Regulación de la autofagia por glucosa en levaduras	18
1.2.2.2.	Regulación de la autofagia por glucosa en células de mamífero	20
1.3.	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA	22
1.3.1.	AUTOFAGIA DEPENDIENTE DE ENERGÍA.....	23
1.3.1.1.	AMPK/mTORC1	23
1.3.1.2.	p53.....	25
1.3.1.3.	p27Kip1.....	26
1.3.2.	VÍAS DEPENDIENTES DEL ESTRÉS OXIDATIVO	27
1.3.2.1.	JNK.....	29
1.3.2.2.	ERK.....	29
1.3.2.3.	p38.....	30
1.3.3.	OTRAS VÍAS.....	30
1.3.3.1.	IKK/NF-κB	30
1.3.3.2.	Sirtuína1 Y FoxO	32
1.4.	IMPLICACIONES PATOLÓGICAS DE LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA.....	32
1.5.	CONCLUSIÓN	34
2.	OBJETIVOS	38
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
3.1.	MATERIALES	42
3.1.1.	LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO.....	42
3.1.2.	REACTIVOS.....	43
3.1.2.1.	Compuestos químicos	43
3.1.2.2.	Inhibidores.....	44

3.1.2.3.	Anticuerpos	44
3.1.3.	TAMPONES Y OTRAS SOLUCIONES.....	44
3.2.	METODOLOGÍA.....	45
3.2.1.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS.....	45
3.2.1.1.	Obtención de extractos celulares.....	45
3.2.1.2.	Cuantificación de la concentración de proteína	46
3.2.1.3.	SDS-PAGE, transferencia electroforética e inmunodetección en membrana ("Western-blot").....	46
3.2.2.	ESTUDIO DE LOS NIVELES DE AUTOFAGIA	47
3.2.2.1.	Cuantificación de vacuolas autofágicas por microscopia electrónica.....	47
3.2.2.2.	Análisis de la actividad autofágica con el marcador GFP-LC3	48
3.2.2.3.	Cuantificación de la degradación de proteínas mediante experimentos de pulso y caza	49
3.2.2.4.	Medida de la masa lisosomal	50
3.2.2.5.	Análisis de los niveles celulares de LC3-II.....	50
3.2.3.	ESTUDIO DE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS	51
3.2.3.1.	Niveles de proteína poliubiquitinadas.....	51
3.2.3.2.	Medida de la actividad de los proteasomas.....	51
3.2.4.	SILENCIAMIENTO DE LA MAPK p38 MEDIANTE RNAs DE INTERFERENCIA	52
3.2.5.	INMUNOFLUORESCENCIA	52
3.2.6.	MEDIDA DE LOS NIVELES DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	53
3.2.7.	MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ATP INTRACELULAR.....	54
3.2.8.	MEDIDA DE LOS NIVELES DE CALCIO.....	54
3.2.9.	CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	55
3.2.10.	ESTADÍSTICA Y OTRAS HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS	56
4.	RESULTADOS	60
4.1.	LA GLUCOSA INDUCE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS	60
4.1.1.	LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA.....	61
4.1.2.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS.....	68
4.2.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA ES UN EFECTO GENERAL PARA DIFERENTES TIPOS CELULARES Y SU INTENSIDAD PUEDE MODULARSE POR OTROS FACTORES	71
4.3.	ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADOS POR GLUCOSA.....	76
4.3.1.	LA GLUCOSA REDUCE LOS NIVELES DE ROS EN EL MEDIO DE KREBS-HENSELEIT ...	77

4.3.2.	LA GLUCOSA NO EJERCE NINGÚN PAPEL EN LA INDUCCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR POR LA AUTOFAGIA.....	78
4.3.3.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA DEPENDE DEL ATP PRODUCIDO	81
4.3.3.1.	La glucosa produce un incremento de los niveles de ATP en las células incubadas en medio de Krebs-Henseleit con glucosa respecto el mismo medio sin glucosa	81
4.3.3.2.	La energía procedente de la glucosa induce la autofagia	82
4.4.	POSIBLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA	85
4.4.1.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE AMPK EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA.....	86
4.4.2.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE LA QUINASA mTORC1 EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA	90
4.4.3.	ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA	92
4.5.	PAPEL DE LA QUINASA p38 EN LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR GLUCOSA.....	94
4.5.1.	p38 ES ACTIVADA EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA	94
4.5.2.	LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA DEPENDE DE LA ACTIVIDAD DE LA MAPK p38.....	97
5.	DISCUSIÓN.....	106
5.1.	REGULACIÓN DE LA PROTEÓLISIS INTRACELULAR POR GLUCOSA.....	106
5.1.1.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA AUTOFÁGICA.....	107
5.1.2.	LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMAS.....	113
5.2.	LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA REQUIERE EN PARTE EL ATP PRODUCIDO A PARTIR DE SU METABOLISMO	117
5.3.	LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE AMPK y mTORC1	120
5.4.	LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA POR UNA VÍA DPEDIENTE DE p38	122
6.	CONCLUSIONES	128
7.	ANEXOS	132
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	138

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURA 1. Mecanismos de degradación intracelular de proteínas por autofagia.....	6
FIGURA 2. Estructura del proteasoma 26S.....	8
FIGURA 3. Sistema de conjugación de la ubiquitina a un sustrato.....	11
FIGURA 4. Etapas de la autofagia en células de mamífero.	13
FIGURA 5. Sistema de conjugación de la proteína LC3 a la membrana autofagosomal.	15
FIGURA 6. Función de las vías dependientes de energía sobre la regulación de la autofagia....	24
FIGURA 7. Regulación de la autofagia por vías dependientes de estrés oxidativo.....	28
FIGURA 8. Otras vías implicadas en la regulación de la autofagia por glucosa.....	31
FIGURA 9. La glucosa induce un aumento de la autofagia.....	63
FIGURA 10. La glucosa induce un aumento de la masa lisosomal.	65
FIGURA 11. El número y el volumen fraccional de las vacuolas autofágicas se duplica en presencia de glucosa.	66
FIGURA 12. La proteólisis intracelular es inducida por la glucosa y esto ocurre en parte a través de la autofagia.....	68
FIGURA 13. La glucosa induce la ubiquitinación de proteínas y aumenta la actividad similar a quimotripsina de los proteasomas.....	69
FIGURA 14. La autofagia inducida por glucosa ocurre no solo en el medio de Krebs-Henseleit sino también en el DMEM.....	72
FIGURA 15. La inducción de la autofagia por glucosa ocurre en diferentes tipos celulares.....	73
FIGURA 16. La autofagia inducida por glucosa también ocurre en presencia de otros factores que la modifican.....	74
FIGURA 17. Los aminoácidos inhiben la proteólisis inducida por glucosa.....	75
FIGURA 18. La glucosa reduce los niveles de ROS producidos por ausencia de la misma.....	78
FIGURA 19. La autofagia favorece la supervivencia celular pero independientemente de la glucosa.....	80
FIGURA 20. Concentraciones crecientes de glucosa aumentan los niveles de ATP y de LC3-II. 82	
FIGURA 21. La inhibición de la glucólisis con oxamato reduce los niveles de ATP y de LC3-II dependientes de glucosa.	84
FIGURA 22. Esquema del mecanismo de regulación de la autofagia por AMPK y mTORC1.....	87
FIGURA 23. La privación de glucosa fosforila AMPK y aumenta ligeramente la concentración citosólica de calcio.	88

FIGURA 24. La glucosa incrementa la fosforilación de 4EBP1 y de mTORC1, pero no la de p70S6K ni la de Ulk1. Además, el tratamiento con rapamicina no afecta significativamente al aumento de los niveles de LC3-II dependientes de glucosa.	90
FIGURA 25. Los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa disminuyen al inhibir p38.....	93
FIGURA 26. La glucosa induce la fosforilación de p38 y su traslocación al núcleo.	95
FIGURA 27. Estrategias utilizadas para investigar el papel de p38 en la inducción de la autofagia por glucosa.	98
FIGURA 28. La inhibición de p38 α reduce los niveles de LC3-II dependientes de glucosa.	99
FIGURA 29. La inducción de la autofagia por glucosa es inhibida con siRNAs para p38 α y también en los MEFs <i>p38</i> ^{-/-}	100
FIGURA 30. La degradación de proteínas inducida por la glucosa es reprimida en las células <i>p38</i> ^{-/-}	101
TABLA I. Inhibidores utilizados.....	132
TABLA II. Anticuerpos utilizados.....	133
TABLA III. Anticuerpos secundarios utilizados	135

LISTA DE ABREVIATURAS

4EBP1	Proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E
ACC	Acetil CoA carboxilasa
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ASK-1	Quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis
ATF	Factor de activación de la transcripción
Atg	Proteína relacionada con la autofagia
Bcl	Linfoma de célula B
BSA	Seroalbúmina bovina
CaMKK	Quinasa 1- α de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina
CREB	Elemento de unión de la respuesta al AMP cíclico
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro
DAPK1	Proteína quinasa 1 asociada a muerte
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FIP200	Proteína de 200 kDa que interactúa con la familia de las quinazas de adhesión focal
FoxO	"Forkhead box" clase O
FURA2-AM	FURA2-acetometil éster
GFP	Proteína verde fluorescente
HEPES	Ácido N-2-Hidroxiethylpiperacina-N'-2'-etanesulfónico
I κ B	Inhibidor del NF- κ B
IKK	Quinasa de I κ B
JNK	Quinasa de c-Jun en la región N-terminal
LAMP-2A	Isoforma 2A de la proteína de membrana asociada a lisosoma
LC3	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
LKB1	Quinasa hepática B1
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEF	Fibroblasto embrionario de ratón
MG132	N-benziloxycarbonilo-leucina-leucina-leucina aldehído
MK2	Proteína quinasa 2 activada por MAPK
MKK	Quinasa de MAPK
NF- κ B	Factor nuclear kappa de las células B activadas
N-Suc-LLVY-MCA	N-Succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-4-metil-coumaril-7-amida
p70S6K	Quinasa de 70 kDa de la proteína ribosomal S6
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de AMPc

PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAB	Proteína de unión a TAK (quinasa activada por el factor β de crecimiento transformante)
TBS	Tampón Tris salino
TORC1	Complejo 1 de la diana de la rapamicina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
TSC	Complejo de proteína de esclerosis tuberosa
Ulk	Quinasa 1 tipo Unc 51
V-ATPasa	ATPasa vacuolar

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ASPECTOS GENERALES DE LA DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

La regulación de la multitud de procesos que ocurren en las células cumple el principal objetivo de preservar la supervivencia a nivel individual de la célula o, en último término, del organismo. Para ello, es imprescindible el mantenimiento estable de ciertas condiciones en las células, estado conocido como homeostasis. Esto ocurre a través del metabolismo celular, mediante un equilibrio dinámico entre los procesos anabólicos y catabólicos.

Los procesos catabólicos producen energía, poder reductor y moléculas básicas a partir de diferentes vías como la glucólisis o la oxidación de ácidos grasos. La degradación intracelular de proteínas (proteólisis intracelular) es también un proceso catabólico, ya que durante el transcurso de la misma se produce la hidrólisis de los enlaces peptídicos en las proteínas mediante la acción de una gran variedad de proteasas que existen en la célula. Después, las unidades básicas obtenidas en ese proceso, los aminoácidos, se reutilizan para la síntesis de nuevas proteínas o son catabolizadas.

Una de las ventajas de la proteólisis intracelular es que permite eliminar los productos que no son útiles para la célula, por ejemplo proteínas mal plegadas o aquellas que ya no se necesitan en una determinada situación metabólica. La eliminación de las proteínas que no son funcionales evita desórdenes celulares que pueden derivar en enfermedades neurodegenerativas como la de Parkinson (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2012), el Alzheimer (Ihara *et al.*, 2012) o la enfermedad de Huntington (Godin *et al.*, 2010). Sin embargo, la proteólisis intracelular no sólo sirve para eliminar estos productos inservibles para la célula sino que además: i) proporciona, en condiciones adversas, aminoácidos para sintetizar nuevas proteínas esenciales para la supervivencia de la célula o como fuente de energía, ii) permite la rápida adaptación de las células a los cambios ambientales, eliminando las proteínas superfluas y sustituyéndolas por otras más adecuadas en las nuevas condiciones, y iii) está implicada en una gran variedad de procesos celulares que además son muy importantes, como el ciclo celular, la transcripción génica, la diferenciación, la modulación de las vías metabólicas, el envejecimiento y la muerte celular por apoptosis o por necrosis (Meyer *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011). La proteólisis intracelular tiene una serie de características y entre ellas

destacaremos tres. En primer lugar, y a diferencia de la mayoría de procesos catabólicos, consume energía. En segundo lugar, se sabe que todas las proteínas se degradan siguiendo una cinética exponencial de primer orden, lo que permite expresar su velocidad de degradación en términos de vida media, que es el tiempo necesario para que la mitad de las moléculas de proteína existentes originariamente sean degradadas. Las vidas medias de las diferentes proteínas en una misma célula varían enormemente, desde unos pocos minutos hasta varios días y, en general, las proteínas necesarias para el mantenimiento de la célula son más estables que las proteínas reguladoras, lo que asegura a la vez la supervivencia de la célula y su rápida adaptación al entorno cambiante. Es decir, puesto que las proteínas de una misma célula tienen vidas medias muy diferentes, la degradación intracelular de proteínas tiene que ser un proceso específico y ésta es su segunda característica importante. Por último, y en tercer lugar, la vida media no es una propiedad intrínseca de una proteína, sino que varía, y mucho, según las condiciones metabólicas en las que se encuentran las células. Esto se debe a que la degradación intracelular de proteínas es un proceso regulado, donde intervienen diferentes vías de señalización centradas principalmente alrededor de dos quinasas: mTORC1 (complejo 1 de la diana de la rapamicina), que es un sensor nutricional y hormonal, y AMPK (proteína quinasa activada por AMP), que es un sensor energético. Por tanto y en resumen, la degradación intracelular de proteínas es un proceso que consume ATP y que no solamente es específico sino que también está altamente regulado, de manera que reconoce, en cada momento, qué proteínas deben degradarse y cuáles no.

La proteólisis intracelular es un proceso muy conservado evolutivamente, lo que indica su importancia para el correcto funcionamiento de los organismos. Se distinguen clásicamente dos categorías de mecanismos proteolíticos en función de si la degradación del sustrato ocurre o no en los lisosomas. El mecanismo más importante de degradación de proteínas independiente de lisosomas es el sistema ubiquitina-proteasoma (del que se hablará en el apartado 1.1.1), aunque también existen otros mecanismos no lisosomales en los que intervienen otras proteasas, como por ejemplo las calpaínas o las caspasas.

Las calpaínas son tiol-proteasas citosólicas compuestas de una subunidad catalítica de 80 kDa y de una subunidad reguladora de 28 kDa (Sorimachi *et al.*, 2012). Las calpaínas se activan por calcio y, aunque existen más de quince calpaínas diferentes con una distribución que en unos casos es ubicua y en otros es específica de tejido, las más importantes y abundantes son la microcalpaína o calpaína I y la milicalpaína o calpaína II, que se activan, respectivamente, por concentraciones micro- y milimolares de ese catión. La actividad de las calpaínas en la célula

está regulada de manera específica por unas proteínas inhibidoras llamadas calpastatinas. Aunque no se ha encontrado ninguna secuencia consenso en los sustratos de las calpaínas (Franco *et al.*, 2005), se han descrito varios de estos, incluyendo factores de transcripción, receptores de membrana, enzimas de señalización y proteínas del citoesqueleto. Sin embargo, las calpaínas casi siempre producen una proteólisis muy limitada por lo que su contribución al conjunto de la degradación intracelular de proteínas es bastante reducida.

Las caspasas son cistein-proteasas muy específicas que cortan a sus sustratos tras un residuo de aspartato. Se sintetizan como precursores inactivos y su maduración ocurre a través de una hidrólisis que origina dos subunidades, una grande y otra de menor tamaño, conteniendo cada una un sitio catalíticamente activo. La función más conocida de las caspasas se refiere a su participación en los procesos de apoptosis. Aunque las caspasas, de las que se han descrito al menos doce en humanos, se han clasificado filogenéticamente en dos grupos, caspasas apoptóticas y caspasas proinflamatorias, también están implicadas en otros procesos como la diferenciación, proliferación y motilidad celular, activación de NF- κ B (factor nuclear kappa de las células B activadas), control del ciclo y supervivencia celular (Lamkanfi *et al.*, 2007; O'Donnell *et al.*, 2011). La actividad de las caspasas suele estar regulada a través de una proteólisis limitada por otras caspasas (de hecho, se puede distinguir también entre caspasas efectoras y caspasas iniciadoras que procesan a las primeras), aunque además puede estarlo por otros mecanismos (Pop *et al.*, 2009).

Finalmente, existen también otras muchas proteasas en diferentes localizaciones de la célula (citósol, mitocondrias, retículo endoplásmico, núcleo, etc.) pero, al igual que ocurre en el caso de las calpaínas y las caspasas, suelen producir cortes muy específicos en sus sustratos por lo que también en este caso su participación en el conjunto de la degradación intracelular de proteínas es muy limitada.

En cuanto a los mecanismos de degradación intracelular de proteínas dependientes de los lisosomas, existen también varios que se representan en la FIGURA 1. Los lisosomas constituyen un grupo de orgánulos de diferentes tamaños, formas, contenido y densidades (Kurz *et al.*, 2008) con una dotación enzimática constituida por una gran variedad de hidrolasas ácidas, incluyendo proteasas a las que se suele denominar con el término de catepsinas. El más importante de los procesos proteolíticos dependientes de los lisosomas es la macroautofagia (de la que se hablará en el apartado 1.1.2). Además de mediante macroautofagia, la proteólisis lisosomal puede ocurrir también por otros mecanismos menos importantes. Los principales de estos son la autofagia mediada por chaperonas y la microautofagia. La autofagia mediada por

chaperonas puede degradar específicamente proteínas que contienen lo que se han denominado secuencias similares a KFERQ y que se pueden encontrar en aproximadamente un 30 % de todas las proteínas (Kiffin *et al.*, 2004). Este mecanismo es especialmente activo en condiciones de ayuno prolongado (más de 24 h). Las proteínas que se degradan mediante autofagia mediada por chaperonas son reconocidas en el citosol por la chaperona Hsc70, que dirige el sustrato hacia la superficie de los lisosomas donde interacciona con la proteína transmembrana LAMP-2A (isoforma 2A de la proteína de membrana asociada a lisosoma). A continuación, el sustrato en una conformación desplegada atraviesa la membrana lisosomal con la ayuda de un complejo de otras chaperonas localizadas en la membrana lisosomal y de una isoforma de la chaperona Hsc70 situada en el lumen de este orgánulo. Una vez dentro del lisosoma, la proteína es degradada rápidamente por las catepsinas allí presentes. La actividad de la autofagia mediada por chaperonas está regulada principalmente por los niveles de LAMP-2A en la membrana lisosomal, que dependen de varios mecanismos. Uno de ellos es su degradación en dos pasos: primero, una metaloproteasa aún no identificada corta la región citosólica de LAMP-2A y, después, una serin-proteasa, la catepsina A, corta a LAMP-2A entre las regiones transmembrana y luminal, lo que lleva a su separación de la membrana y a su degradación en el lisosoma. Además, existe una reserva de moléculas de LAMP-2A en vesículas del lumen lisosomal y que es recuperada por la membrana lisosomal en condiciones que inducen la autofagia mediada por chaperonas. También se ha descrito, en determinadas condiciones, otro mecanismo para aumentar los niveles de la proteína LAMP-2A en la membrana lisosomal consistente en disminuir la degradación de LAMP-2A y a la vez aumentar su expresión (Kaushik *et al.*, 2011).

Otra de las vías lisosomales de degradación intracelular de proteínas es la microautofagia, en la que se producen unas extensiones de la membrana lisosomal que capturan pequeñas porciones de citoplasma. Estas extensiones de la membrana se fusionan para formar bolsas intralisosomales de diferentes tamaños, conteniendo material citosólico, o incluso orgánulos, que terminan por degradarse por la acción de las hidrolasas que contiene el lisosoma. En las células de mamífero se conoce muy poco sobre la regulación de la microautofagia. Por ejemplo, se ha descrito que, a diferencia de la macroautofagia, los estímulos que normalmente inducen ésta, como la privación de nutrientes durante 12 o 24 h, no provocan un aumento de la microautofagia, aunque sí se induce la formación de protuberancias de la membrana lisosomal (Mijaljica *et al.*, 2011).

Además de por los mecanismos anteriores, diversas proteínas celulares pueden llegar a los lisosomas por otros diferentes. Uno de ellos es la heterofagia o endocitosis, en la que se degradan, junto al material extracelular, algunas proteínas de la membrana plasmática que, a diferencia, por ejemplo, del receptor de las LDL o el de la transferrina, no son recicladas para volver a la membrana plasmática durante su endocitosis. Otro es la crinofagia, en la que los gránulos de secreción producidos en exceso se fusionan con los lisosomas, en vez de con la membrana plasmática, para degradar las proteínas que contienen (Sandberg *et al.*, 2006). Todos estos mecanismos hacen que la degradación lisosomal de proteínas intracelulares sea un proceso muy complejo.

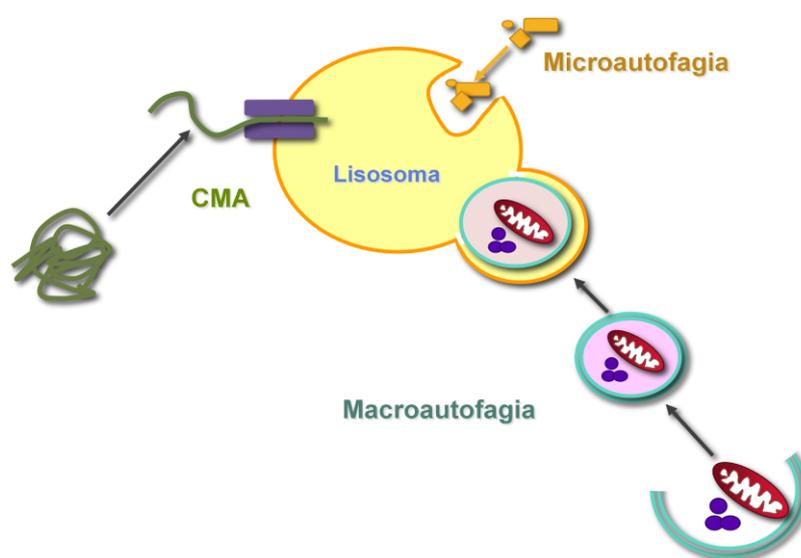


FIGURA 1. Mecanismos de degradación intracelular de proteínas por autofagia.

La figura muestra tres formas diferentes de autofagia. La microautofagia consiste en la incorporación directa de componentes citoplasmáticos a los lisosomas. La autofagia mediada por chaperonas (CMA) degrada de forma selectiva proteínas citosólicas que contienen secuencias similares a la KFERQ. La forma de autofagia más importante es la macroautofagia, en la que componentes citoplasmáticos son rodeados por una doble membrana, formando un autofagosoma que al fusionarse con lisosomas determina la degradación del contenido secuestrado. Ver detalles en el texto.

En los párrafos anteriores hemos introducido brevemente los mecanismos lisosomales y no lisosomales de degradación intracelular de proteínas. En los dos siguientes apartados se describen más detalladamente los dos procesos proteolíticos más importantes en las células: el sistema ubiquitina-proteasomas y la macroautofagia.

1.1.1. EL SISTEMA UBICUITINA-PROTEASOMAS

El sistema ubiquitina-proteasomas degrada principalmente proteínas marcadas por cadenas de poliubiquitina, aunque, como citaremos más abajo, existen ejemplos de degradación de sustratos por los proteasomas de forma independiente del polipéptido ubiquitina. La degradación de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasomas se lleva a cabo en los proteasomas, que se localizan tanto en el citosol como en el núcleo (Rivett *et al.*, 1992; Palmer *et al.*, 1996; Rivett *et al.*, 1993). El componente principal de todos los proteasomas es el proteasoma 20S, una estructura con forma de barril constituida por cuatro anillos heteroheptaméricos: dos anillos α idénticos y dos β también idénticos. Como se observa en la FIGURA 2, los anillos α se localizan en los dos extremos del barril, mientras que los anillos β se sitúan en el centro del mismo (Murata *et al.*, 2009). La formación del complejo 20S requiere un proceso de ensamblaje en el que participan chaperonas como PAC1-4 y Ump1. El dímero PAC1-PAC2 ensambla las unidades α en un anillo. A este anillo α se une el anillo β con la ayuda de PAC3-PAC4 para formar medio proteasoma. Así, la unión de dos de estos medio-proteasomas por la chaperona Ump1 origina una estructura proteasomal conocida como pre-holeoproteasoma, en el que las subunidades catalíticas $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$ aún contienen los péptidos N-terminales intactos. Finalmente, el proteasoma 20S adquiere su capacidad proteolítica cuando el extremo N-terminal de esas subunidades es degradado en el proteasoma de forma autocatalítica (Chondrogianni *et al.*, 2012).

Se pueden distinguir tres actividades proteolíticas diferentes en el proteasoma en función de la subunidad β que participe: i) similar a caspasas ($\beta 1$), que corta las proteínas tras un residuo de glutamato o aspartato, ii) similar a tripsina ($\beta 2$), que corta las proteínas tras una arginina o una lisina y iii) similar a quimotripsina ($\beta 5$), que corta las proteínas tras una tirosina o una fenilalanina (Kisselev & Goldberg, 2005). En determinadas situaciones, por ejemplo en respuesta a señales pro-inflamatorias, se forman unos proteasomas llamados inmunoproteasomas que contienen, en lugar de las subunidades catalíticas constitutivas mencionadas antes, otras inducidas que se denominan $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$. En los inmunoproteasomas las especificidades de sustrato están algo alteradas respecto al proteasoma 20S. Cuando una proteína entra por el poro central de uno de los anillos del extremo del barril y es degradada en el interior de este, los péptidos resultantes de la degradación salen al exterior por el mismo poro para terminar de degradarse en el citosol. Esto permite que en un mismo proteasoma se estén degradando a la vez proteínas que entran

por cada uno de los poros y confiere a este una mayor capacidad proteolítica (Hutschenreiter *et al.*, 2004).

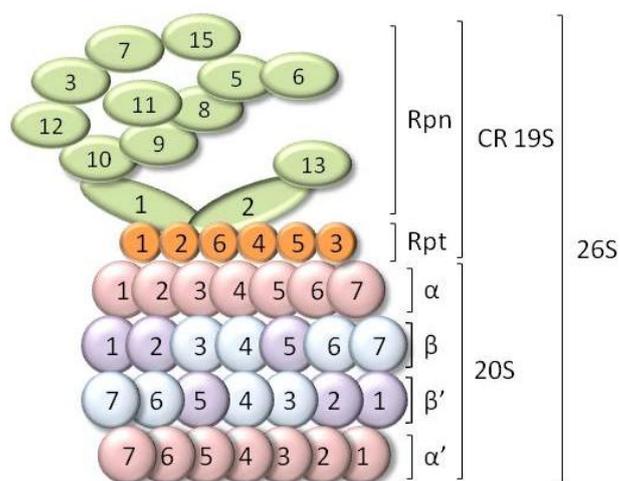


FIGURA 2. Estructura del proteasoma 26S.

El proteasoma 20S está formado por dos anillos α externos y dos anillos β internos, constituidos cada uno por siete subunidades distintas pero estructuralmente similares en cada anillo. En el anillo β , tres subunidades ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$) tienen en su extremo amino terminal residuos de treonina con actividad hidrolasa que rompen los enlaces peptídicos de los sustratos que se internalizan en el núcleo del proteasoma. La unión de un complejo regulador 19S (CR 19S) a uno de los extremos del proteasoma 20S da lugar al proteasoma 26S. El complejo regulador 19S reconoce las proteínas poliubiquitinadas y las desubiquitina para recuperar las unidades de ubiquitina. El complejo regulador 19S está formado por dos complejos: una base y una tapa unidas por la subunidad Rpn10. La base está constituida por seis AAA^+ ATPasas (Rpt1-Rpt6) y tres subunidades no-ATPasa (Rpn1, Rpn2 y Rpn13), mientras que la tapa consiste en nueve subunidades no-ATPasas (Rpn3, 5-9, 11, 12 y 15).

Diversos complejos reguladores pueden unirse de forma reversible a los extremos del núcleo catalítico 20S. Los más conocidos son el complejo regulador 19S y el 11S que confieren diferentes propiedades adicionales al proteasoma 20S (Murata *et al.*, 2009). La unión del complejo regulador 19S al anillo α del proteasoma 20S forma el proteasoma 26S, en el que ocurre un cambio conformacional de los extremos N-terminales de las subunidades del anillo α de forma que el tamaño del poro y del canal central de entrada al proteasoma aumentan. El complejo regulador 19S se divide en dos subcomplejos (FIGURA 2): una base y una tapa, unidas por la subunidad Rpn10. La base del complejo regulador 19S se une a uno de los extremos del proteasoma 20S y está compuesta por seis subunidades con actividad de ATPasa (las AAA^+ -ATPasas Rpt1-6) y tres subunidades no-ATPasa (Rpn1, 2 y 13). El segundo subcomplejo del complejo regulador 19S corresponde a la tapa del proteasoma y consta de las subunidades

Rpn3, Rpn5-9 y Rpn11, 12 y 15 (Lander *et al.*, 2012). El complejo regulador 19S confiere, al proteasoma 26S resultante, la actividad ATPasa necesaria para desplegar los polipéptidos y facilitar su entrada hasta las subunidades con capacidad proteolítica en los anillos β del proteasoma 20S (Thompson *et al.*, 2009). La actividad del proteasoma depende, por tanto, de la disponibilidad de energía.

Otro regulador de la actividad del proteasoma es el complejo 11S (REG o PA28), formado por dos tipos de subunidades: PA28 α y PA28 β . El complejo regulador 11S, de igual modo que el complejo regulador 19S, se une a los anillos α del proteasoma 20S y facilita la entrada de sustratos hasta los anillos β (Knowlton *et al.*, 1997; Whitby *et al.*, 2000). La subunidad PA28 α junto con la PA28 β forman un heteroheptámero ($\alpha_3\beta_4$ o $\alpha_4\beta_3$) con alta afinidad por el proteasoma y el complejo resultante (proteasoma-PA28) se localiza tanto en el citosol como en el núcleo (Brooks *et al.*, 2000). Existen otros complejos reguladores proteasomales, como PA28 γ que sólo se encuentra en el núcleo y que forma un homoheptámero con una subunidad y parecida a las anteriores (Rechsteiner *et al.*, 2000), PA200 o el inhibidor de proteasomas PI31 e, incluso a veces, pueden unirse dos complejos reguladores diferentes en cada extremo del proteasoma 20S para formar proteasomas híbridos, lo que refleja la gran diversidad de proteasomas posibles.

La actividad de los proteasomas, además de estar regulada por esos complejos, también puede estarlo por modificaciones postraduccionales, como la O-glicosilación o la fosforilación. Por ejemplo, la actividad ATPasa del proteasoma 26S puede ser inhibida por la O-GlcNAc transferasa, al añadir O-GlcNAc a la subunidad Rpt2 (ATPasa de 19S). Otro ejemplo lo proporciona la fosforilación por PKA (proteína quinasa dependiente de AMPc) de la subunidad Rpt6 (Ser120), otra AAA⁺-ATPasa del complejo regulador 19S, y que tiene como consecuencia una mayor actividad de las actividades tripsina y quimotripsina del proteasoma 20S (Zhang *et al.*, 2007).

Como hemos mencionado anteriormente, el sistema ubiquitina-proteasomas lleva a cabo la degradación de las proteínas que han sido marcadas con cadenas de poliubiquitina. La ubiquitina es una proteína globular de 76 aminoácidos y 8,5 kDa, altamente conservada desde levaduras a mamíferos aunque ausente en procariontes. La ubiquitina se une covalentemente a su sustrato mediante un complejo sistema de conjugación en el que intervienen tres tipos de enzimas diferentes: E1 (enzima activadora de ubiquitina), E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) y E3 (ubiquitina-proteína ligasa o ubiquitina ligasa) (Hershko & Ciechanover, 1998). En la FIGURA 3 se representan los diferentes pasos de la conjugación de la ubiquitina al

sustrato. Durante el primer paso, el residuo carboxilo-terminal de la Gly76 de la ubiquitina se adenila y se forma un enlace tioéster entre esa glicina y la cisteína del sitio activo de la enzima E1. Una vez activada la ubiquitina, se transfiere desde la enzima E1 a la cisteína del sitio activo de la enzima E2. Finalmente, una E3 ubiquitina ligasa cataliza la transferencia de la ubiquitina desde la enzima E2 al sustrato. El enlace tioéster entre la ubiquitina y la E2 es atacado por un grupo ϵ -NH₂ de una lisina del sustrato, lo que origina un enlace isopeptídico. Así queda unida la glicina terminal de la ubiquitina al grupo ϵ -NH₂ de la lisina del sustrato. En ocasiones, por ejemplo cuando no existe una lisina accesible en el sustrato, la ubiquitina se puede unir también al grupo amino del extremo N-terminal del sustrato. La especificidad de la ubiquitinación de proteínas viene determinada, no por la E1, ni por las diferentes E2, sino por los varios centenares de E3.

En la secuencia de la propia ubiquitina existen 7 lisinas que pueden unir nuevas moléculas de ubiquitina (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48 y Lys63), por lo que se pueden formar cadenas de poliubiquitina lineales o ramificadas. El tipo de cadena que se forma es importante a la hora de definir el destino del sustrato. Las moléculas de ubiquitina unidas a través de las Lys48, Lys11 y Lys63 son las más frecuentes y, de estas, las cadenas de Lys48 y Lys11 (sobre todo la primera) son las señales más importantes para dirigir a las proteínas marcadas por ellas a la degradación proteasomal (Komander, 2009). Por el contrario, la conjugación de las ubiquitinas vía Lys63 se asocia sobre todo a la participación de los sustratos implicados en la regulación de la reparación del DNA, en la transducción de señales y en el tráfico de proteínas. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la ubiquitinación a través de Lys63 o de Lys29 también puede dirigir algunos sustratos a su degradación por los proteasomas o por los lisosomas (Xu *et al.*, 2009; Wong & Cuervo, 2010; Saeki *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2008). La ubiquitinación de los sustratos, además de determinar el destino de estos, también influye en su cinética de degradación. Un ejemplo extremo lo proporcionan los sustratos ubiquitinados en las Lys6, que muestran una menor afinidad en su interacción con el proteasoma 26S por lo que se acumulan sin degradarse (Shang *et al.*, 2005). La homogeneidad de las cadenas de poliubiquitina facilita que los sustratos sean más eficientemente procesados por los proteasomas, como ocurre por ejemplo cuando las ubiquitinas solamente están unidas unas a otras a través de Lys48 (Wong & Cuervo, 2010). Las ubiquitinas pueden también enlazarse entre sus extremos N- y C-terminales por la acción de una E3 ubiquitina ligasa específica, el complejo LUBAC (Gerlach *et al.*, 2011).

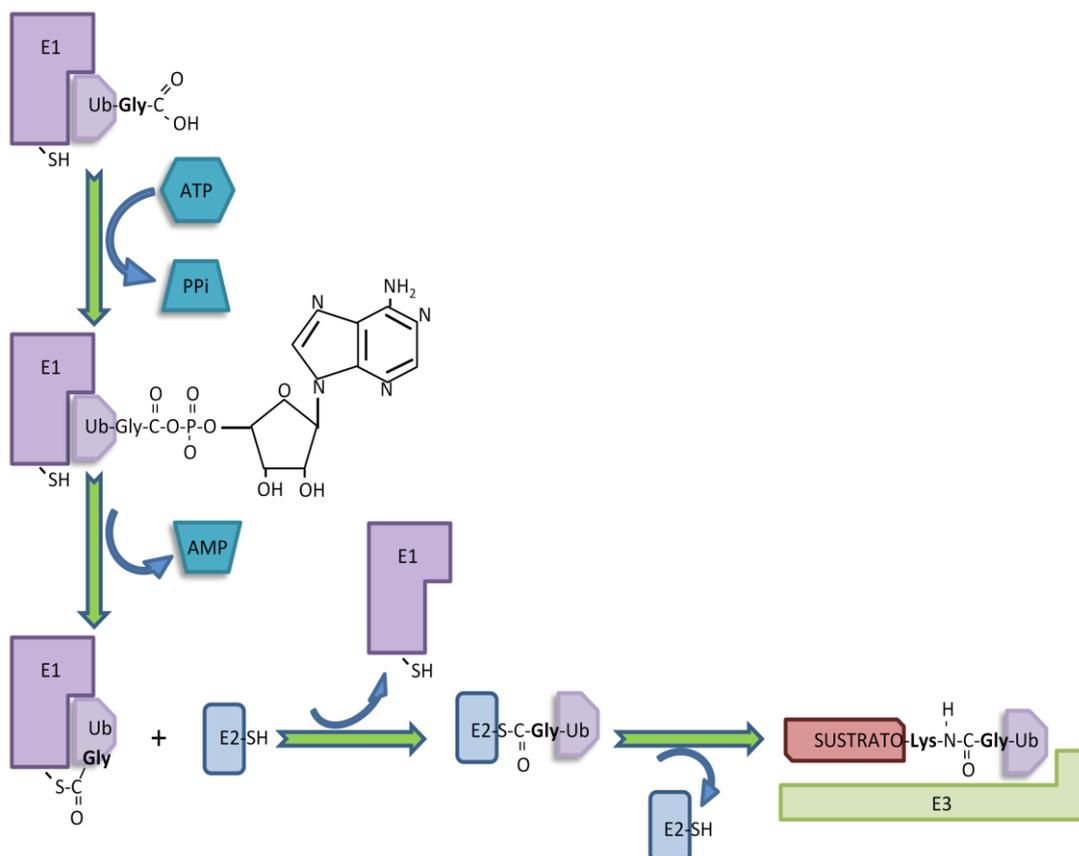


FIGURA 3. Sistema de conjugación de la ubiquitina a un sustrato.

El grupo carboxilo terminal de la ubiquitina se activa por la unión a una molécula de AMP y la ubiquitina se transfiere a un grupo tiol de la enzima E1. Esto forma un enlace tioéster de alta energía que será utilizada para transferir la ubiquitina a una enzima E2. Finalmente, con la ayuda de una enzima E3, la ubiquitina activa es transferida a un grupo NH_2 (habitualmente un $\epsilon\text{-NH}_2$ en una lisina) en la proteína sustrato, formando un enlace isopeptídico.

Las proteínas marcadas con cadenas lineales de al menos cuatro ubiquitinas son degradadas por los proteasomas (Thrower *et al.*, 2000), sin embargo algunas proteínas como la PAX3 (Boutet *et al.*, 2007) o la fosfolipasa D (Yin *et al.*, 2010) pueden ser degradadas por los proteasomas cuando presentan una ubiquitinación simple o múltiple. En otros casos, la ubiquitina puede unirse al sustrato en residuos diferentes a la lisina (a cisteínas, serinas o treoninas) como ocurre con la proteína BID o con la neurogenina (Tait *et al.*, 2007; McDowell *et al.* 2010). Finalmente, es necesario anotar que ciertas proteínas, como la ornitina decarboxilasa o $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ (inhibidor del $\text{NF-}\kappa\text{B}\alpha$), son degradadas por los proteasomas sin haber sido marcadas con ubiquitinas (Kravtsova-Ivantsiv & Ciechanover, 2012). Estos datos proporcionan una idea de la alta especificidad de reconocimiento y el amplio abanico de posibilidades en la regulación de las proteínas para su degradación por los proteasomas.

La ubiquitinación es una modificación reversible de proteínas, ya que las cadenas de ubiquitinas pueden ser eliminadas de sus sustratos por unas proteasas llamadas desubiquitinasas. En el genoma humano se han identificado más de cien genes que parece que codifican para desubiquitinasas, lo que sugiere cierta especificidad en el reconocimiento de los sustratos. Las funciones de las desubiquitinasas son, entre otras, mantener la disponibilidad de suficientes moléculas de ubiquitina que serán reutilizadas en próximos marcajes de proteínas y proporcionar un control adicional sobre la degradación de los sustratos antes de que lleguen al proteasoma. Por ejemplo, la desubiquitinasa Rpn11 asociada a los proteasomas escinde con un único corte las cadenas de poliubiquitina del sustrato que va a ser degradado (Verma *et al.*, 2002). De esta forma, la cadena de poliubiquitinas queda libre para que otras desubiquitinasas regeneren las ubiquitinas libres y el sustrato puede entrar por el canal central proteasomal para ser procesado en los anillos catalíticos del proteasoma. En cambio, otras desubiquitinasas, como Uch37 y Ubp6, eliminan las moléculas de ubiquitina de los sustratos aún libres en el citosol antes de que muestren afinidad por los proteasomas y sean degradados (Wong & Cuervo, 2010).

El correcto funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasomas es de gran importancia para la célula y cualquier alteración en su funcionamiento puede provocar la acumulación de proteínas mal plegadas. Estas alteraciones han sido descritas por ejemplo en diferentes enfermedades neurodegenerativas, en infecciones microbianas, en desórdenes inmunológicos o en el cáncer (Edelmann *et al.*, 2011). Por ejemplo, en el caso de enfermedades neurodegenerativas como la del Parkinson la función mitocondrial está comprometida (Keane *et al.*, 2011), lo que reduce la producción de ATP que, como hemos comentado, es necesario para un adecuado funcionamiento del sistema ubiquitina-proteasomas (Keane *et al.*, 2011). Además, la actividad catalítica de los proteasomas también se ve reducida con el envejecimiento, como ocurre en las moscas *Drosophila melanogaster* más viejas, en las que se produce un descenso del 60 % en la actividad de los proteasomas con respecto a las más jóvenes y esto se acompaña de una disminución en los niveles de ATP y de una menor supervivencia (Vernace *et al.*, 2007). Por otra parte, el uso de la droga Bortezomib, un inhibidor de los proteasomas, ha tenido mucho éxito en el tratamiento del mieloma múltiple debido, entre otras razones, a que impide la degradación que ocurre en esas células de proteínas pro-apoptóticas, lo que facilita la inducción de la muerte de las células cancerosas (Chen *et al.*, 2011a).

1.1.2. MACROAUTOFAGIA

La macroautofagia o para simplificar autofagia ocurre en prácticamente todas las células eucarióticas y es un proceso que recicla los componentes celulares y aporta nutrientes y energía para los requerimientos biosintéticos de la célula. La carencia de nutrientes suele ser un potente estímulo de la autofagia, proceso en el que se forman las estructuras membranosas que encierran porciones de citoplasma y que finalmente se fusionan con los endosomas y los lisosomas (FIGURA 4). Contrariamente al sistema ubiquitina-proteasomas, la autofagia es un proceso proteolítico mayoritariamente inespecífico, aunque también pueden degradarse de forma más específica mitocondrias, peroxisomas, ribosomas, etc. mediante mecanismos conocidos como mitofagia, pexofagia, ribofagia, etc. (Knecht *et al.*, 2009).

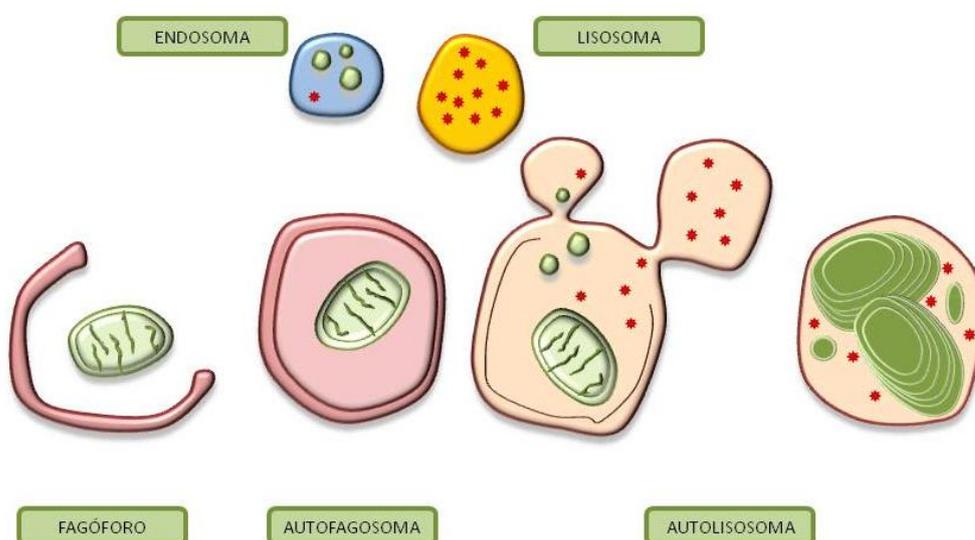


FIGURA 4. Etapas de la autofagia en células de mamífero.

Una porción de citoplasma, que frecuentemente incluye orgánulos, es atrapada por una doble membrana que crece hasta que los extremos se unen y forma una estructura vacuolar conocida como autofagosoma. La membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana de endosomas y de lisosomas. Las hidrolasas de los lisosomas degradan primero la membrana interna del autofagosoma y, finalmente, el material que había sido secuestrado.

A diferencia de la vía ubiquitina-proteasomas, en la autofagia participan los lisosomas. De forma general, los lisosomas son estructuras muy heterogéneas que se pueden caracterizar como estructuras compartimentalizadas rodeadas por una o dos membranas, en cuyo interior pueden apreciarse muchas veces depósitos densos y restos membranosos dispuestos desordenadamente. Los lisosomas contienen un gran número de hidrolasas ácidas, incluyendo varias catepsinas, que requieren un pH ácido para mantener una adecuada actividad (Knecht *et al.*, 2009; de Duve, 1983). El pH ácido del lumen lisosomal se mantiene gracias a la actividad

de las V-ATPasas (ATPasas vacuolares), que son bombas de protones que se encuentran ancladas en la membrana lisosomal por su dominio V_0 (Kane, 2006).

En la autofagia, durante los procesos de formación, elongación y cierre de una doble membrana alrededor de las porciones de las células que se van a degradar participan una serie de proteínas conocidas como Atg, de "Autophagy gene" o proteína relacionada con la autofagia, que fueron caracterizadas en levaduras durante la década de los años ochenta. En levaduras, esa membrana procede de unas estructuras pre-autofagosomales. En mamíferos no se ha encontrado una estructura equivalente, aunque se ha propuesto que puede proceder de un subdominio del retículo endoplásmico llamado omegasoma, enriquecido con fosfatidilinositol 3-fosfato (Axe *et al.*, 2008) y al que se añaden proteínas y lípidos de otros orígenes. En la membrana autofágica se forma el complejo Ulk (quinasa 1 tipo Unc 51) que está formado por Ulk1/2 (homólogo en mamíferos de Atg1), un homólogo en mamíferos de Atg13, FIP200 (proteína de 200 kDa que interactúa con la familia de las quinasas de adhesión focal, homólogo en mamíferos de Atg17) y Atg101. El complejo Ulk inicia la nucleación de la membrana que permite el secuestro del material citoplásmico. Además, aunque es desconocida la función exacta, se sabe que es necesario el complejo PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa), ya que el complejo formado por WIP1 (el homólogo en mamíferos de Atg18) con Atg2 y Atg9 de la membrana autofagosomal se une al fosfatidilinositol 3-fosfato generado, favoreciendo la curvatura y nucleación de la membrana. Durante la formación de la membrana autofagosomal y la nucleación participan dos sistemas de conjugación independientes que se desarrollan paralelamente hasta confluir en la lipidación de LC3 (proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3; homólogo en mamíferos de Atg8). Estos sistemas de conjugación se llevan a cabo comúnmente por Atg7, que tiene una función similar a la enzima E1 del sistema ubiquitina-proteasomas, junto con las proteínas Atg10 y Atg3, que tienen funciones similares a las enzimas E2 (FIGURA 5). De este modo, Atg7-Atg10, por un lado, y Atg7-Atg3, por otro, actúan sobre Atg12-Atg5 y LC3, respectivamente. LC3 es procesado por la cisteína proteasa Atg4 para exponer una glicina C-terminal y luego es lipidado con la unión de una fosfatidiletanolamina (Taherbhoy *et al.*, 2011). La forma LC3-fosfatidiletanolamina se conoce en mamíferos como la proteína LC3-II, que se utiliza como un marcador bastante adecuado de los niveles de autofagosomas, ya que es la única proteína específica de esas estructuras. Una vez formados los autofagosomas, se desplazan a lo largo de los microtúbulos de forma dependiente de dineína (Kimura *et al.*, 2008) y se fusionan con endosomas tardíos y, finalmente, con lisosomas, dando lugar a los autolisosomas. Al fusionarse las membranas de los autofagosomas con la de los endosomas tardíos y los lisosomas, las enzimas hidrolíticas de

estos entran en contacto con los sustratos de los autofagosomas y comienza la degradación del material secuestrado (Chen & Klionsky, 2011).

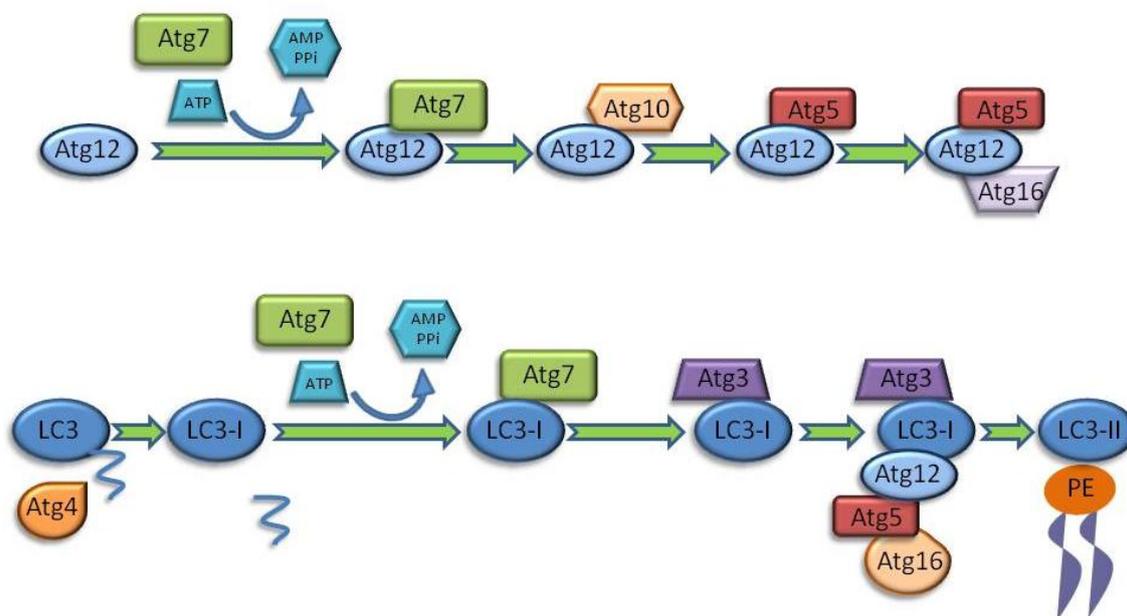


FIGURA 5. Sistema de conjugación de la proteína LC3 a la membrana autofagosomal.

La lipidación de la proteína LC3 por una fosfatidiletanolamina de la membrana autofagosomal consta de dos pasos en los que están implicadas varias proteínas Atg. Estos pasos implican a sistemas de conjugación similares al de conjugación de la ubiquitina con sus sustratos. En primer lugar (ver en la parte de arriba de la figura), debe formarse el complejo Atg5-Atg12-Atg16, que actuará como una enzima E3. Atg7, una enzima similar a E1, activa la proteína Atg12, similar a una ubiquitina, y la transfiere a la proteína Atg10 que permite la unión de Atg12 por la glicina de su extremo C-terminal a una lisina de Atg5. Posteriormente, el conjugado Atg5-Atg12 se asocia no-covalentemente con Atg16. Por otra parte (ver en la parte de abajo de la figura), el extremo carboxilo terminal de la proteína LC3 en el citosol es escindido por la proteasa Atg4. De esta forma, queda expuesto un residuo de glicina que es activado por una adenilación catalizada por la proteína Atg7 y, posteriormente, la proteína LC3 es transferida a la proteína Atg3, una enzima similar a E2. Finalmente, el complejo Atg5-Atg12-Atg16 media la conjugación de LC3 a una fosfatidiletanolamina de la membrana del autofagosoma resultando en la forma LC3-II.

Como hemos comentado, en la formación de los autofagosomas está implicado el complejo PI3K, que está formado por las proteínas PI3K, p150, Beclin1 y Barkor (cuyos homólogos en levaduras son Vps34, Vps15, Atg6 y Atg14, respectivamente), entre los que Beclin1 tiene un papel predominante. Beclin1 contiene un dominio BH3 que determina su interacción con otras proteínas y condiciona su efecto regulador sobre la autofagia. En condiciones de abundancia de nutrientes, las proteínas Bcl (linfoma de célula B)-2 y Bcl-XL se unen al dominio BH3 de Beclin1, lo que reduce su actividad pro-autofágica. En cambio, el ayuno induce su separación.

Esta unión entre Beclin1 y Bcl-2 es muy importante en los diferentes procesos reguladores de la autofagia. Brevemente, en mamíferos existen, al menos, tres modos de regular la asociación entre Beclin1 y Bcl-2: a) la competencia de proteínas de la familia Bcl-2 por unirse al dominio BH3; b) la unión de otras proteínas a Beclin1; y c) la fosforilación de Bcl-2 o de Beclin1. Como ejemplos de esta última forma de regulación, Beclin1 puede ser fosforilada por DAPK1 (proteína quinasa 1 asociada a muerte) o Bcl-2 puede serlo también por JNK (quinasa de c-Jun en la región N-terminal) y la MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) p38 (Kang *et al.*, 2011). Estas fosforilaciones rompen la interacción de Beclin1 con Bcl-2, permitiendo que Beclin1 se una al complejo PI3K y se induzca la autofagia (Kang *et al.*, 2011). Otras proteínas que pueden unirse a Beclin1 para facilitar la formación de los autofagosomas son: Barkor, que se une a la membrana del autofagosoma (Matsunaga *et al.*, 2009); UVRAG, presente en endosomas, que mantiene la estabilidad de Beclin1 y activa a la PI3K de clase III (Takahashi *et al.*, 2007); y Vmp1, que induce la conversión de LC3-I a LC3-II (Vaccaro *et al.*, 2008).

1.2. REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA

La autofagia es un proceso muy regulado en el que participan multitud de quinasas, factores de transcripción y otras proteínas, siendo las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula las que van a determinar, de forma mayoritaria, la inducción o la represión de la autofagia. En el apartado siguiente, nos referiremos brevemente a la regulación de la autofagia de forma dependiente de nutrientes, para centrarnos finalmente en la regulación ejercida por la glucosa.

1.2.1. REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR NUTRIENTES

En los organismos pluricelulares, el crecimiento y la división celular ocurren cuando las células disponen de suficiente cantidad de energía y de nutrientes, que aportan las unidades básicas para la biosíntesis de las moléculas necesarias. En condiciones de escasez de nutrientes, la autofagia sirve como un mecanismo de adaptación rápido y, gracias a ella, las células obtienen energía y las subunidades básicas necesarias para los diferentes procesos biosintéticos esenciales para la supervivencia celular en esas condiciones. Por eso, y por lo general, la privación de nutrientes actúa como una señal de alarma que produce la activación de la autofagia.

Como hemos mencionado anteriormente, la autofagia es un proceso altamente regulado, en el que el sensor nutricional mTORC1 es el principal complejo que la controla, activándose en presencia de factores de crecimiento y de altos niveles de aminoácidos y energía e inhibiendo la autofagia. mTORC1 es un complejo formado por la proteína quinasa mTOR, Raptor, mLST8 y PRAS40. En la regulación de ese complejo son importantes Raptor, que es una proteína que facilita la interacción de mTOR con sus sustratos, como p70S6K (quinasa de 70 kDa de la proteína ribosomal S6) y 4EBP1 (proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E), y PRAS40, que es un regulador negativo de mTORC1 que si es fosforilado por el propio mTOR o por Akt se separa del complejo permitiendo la actividad de mTOR. La activación de mTORC1, por ejemplo en presencia de la hormona insulina cuyo mecanismo de inhibición de la autofagia ha sido ya bien estudiado, ocurre a través de PI3K de clase I, que activa a Akt y que a su vez inhibe a TSC1/2 (complejo de proteína de esclerosis tuberosa), de forma que la GTPasa activadora de mTORC1 Rheb puede fosforilar a este para que se inhiba la autofagia. También se ha descrito que los aminoácidos pueden activar a mTORC1 (Sancak *et al.*, 2010), aunque las vías de señalización a través de las que lo hacen son menos conocidas. Se piensa que en la activación de mTORC1 por diversos factores, esta quinasa es reclutada en las membranas de los lisosomas de forma dependiente del complejo GTPasa Rag (A/B/C/D). Una vez allí, Rheb fosforila a mTORC1 y esta quinasa inhibe la autofagia. Por el contrario, en ausencia de factores de crecimiento y de otros activadores de mTORC1 esto no ocurre y se induce la autofagia (Esteban *et al.*, 2007).

En levaduras en condiciones óptimas de crecimiento, TORC1 fosforila a la proteína Atg13 que se separa de Atg1 y Atg17, lo que impide el inicio de la autofagia. Esto se comprueba con levaduras en las que Atg13 tiene mutado el sitio de fosforilación dependiente de TORC1 y por tanto no se inhibe la autofagia. Por el contrario, en ausencia de nutrientes Atg13 no es fosforilada, por lo que se forma el complejo Atg1-Atg13-Atg17 y se induce la autofagia. En vertebrados, Ulk1 y Atg13 son fosforiladas por mTORC1 en presencia de nutrientes y, a pesar de que la Atg13 fosforilada no se separa del complejo Ulk, se inhibe la autofagia. Sin embargo, durante el ayuno Ulk1 y Atg13 son desfosforiladas, lo que permite la translocación del complejo Ulk-Atg13-Atg17 a la membrana del autofagosoma y la inducción de la autofagia (Akers *et al.*, 2012).

1.2.2. REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

Otro nutriente implicado en la regulación de la autofagia es la glucosa y como nutriente que es cabe esperar una función represora sobre la autofagia. Así, la falta de glucosa conduciría a un incremento de la autofagia con el fin de proporcionar a la célula energía y aminoácidos para ser utilizados en la biosíntesis de proteínas adecuadas a esa situación. De hecho, el ayuno de glucosa estimula la autofagia y el metabolismo de aminoácidos glucogénicos en hígado de ratones para proporcionar más glucosa y mantener sus niveles en la sangre. En cambio, el aporte de glucosa induce la secreción de insulina y se inhibe la autofagia (Ezaki *et al.*, 2011). Sin embargo, aún existe cierta controversia sobre el papel de la glucosa en la autofagia. A continuación desarrollaremos brevemente los mecanismos reguladores de la autofagia por glucosa en levaduras, y después nos centraremos en las células de mamíferos.

1.2.2.1. Regulación de la autofagia por glucosa en levaduras

Aunque la autofagia se describió por primera vez en células de mamífero en los años 60 del siglo pasado, la mayor parte del conocimiento que se posee actualmente acerca de la maquinaria molecular de la autofagia procede de estudios realizados con posterioridad en levaduras y que, inicialmente, fueron llevados a cabo en los laboratorios de Yoshinori Ohsumi en Japón, Michael Thumm en Alemania y Dan Klionsky en EE.UU.

A finales de la década de los 90, se describieron dos formas diferentes de autofagia en levaduras: la micro y la macroautofagia, cuya existencia se había postulado ya con anterioridad en células de mamífero. Durante la microautofagia, la membrana de la vacuola envuelve porciones del citoplasma que incorpora en su interior con la consiguiente formación de vesículas intravacuolares que serán después degradadas junto a su contenido por las enzimas hidrolíticas de la vacuola (Mizushima, 2007). En la macroautofagia, los componentes citoplasmáticos son rodeados por una doble membrana procedente de las estructuras pre-autofagosomales que llega a cerrarse formando un orgánulo conocido como autofagosoma (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). A continuación, la membrana externa del autofagosoma se fusiona con la membrana vacuolar. El orgánulo resultante, llamado cuerpo autofágico y ahora ya de membrana sencilla, entra en la vacuola y se degrada por las hidrolasas vacuolares junto con su contenido (Baba *et al.*, 1994).

El principal regulador de la autofagia en levaduras es el nitrógeno, aunque la glucosa juega también un papel importante. Por ejemplo, durante el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en un medio sin glucosa se induce la síntesis de enzimas clave en la regulación de la gluconeogénesis (tales como la fructosa-1,6-bisfosfatasa, la malato deshidrogenasa y la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) y de los transportadores de galactosa y maltosa. Cuando estas células se transfieren a un medio con glucosa, se reprime la transcripción de estos genes (por un proceso general llamado represión catabólica) y las proteínas inducidas son degradadas por autofagia (Brown & Chiang, 2009). En el caso de levaduras metilotróficas, como *Pichia pastoris*, durante la incubación en un medio que contiene metanol se induce la síntesis de enzimas que facilitan la asimilación de este alcohol, como la alcohol oxidasa o la formiato deshidrogenasa, que se acumulan en los peroxisomas o en el citosol, respectivamente. Una vez que las enzimas acumuladas en los peroxisomas no son necesarias, los peroxisomas pueden ser degradados selectivamente por macroautofagia (macropexofagia) o por microautofagia (micropexofagia). Durante la macropexofagia tiene lugar el secuestro en el citoplasma de peroxisomas por orgánulos de doble membrana que se fusionan con la vacuola, mientras que la micropexofagia consiste en la captación de un grupo de peroxisomas por extensiones de la membrana vacuolar para incorporarlos a la vacuola, donde son finalmente degradados. Por ejemplo, en *P. pastoris* cuando el medio con metanol se sustituye por otro medio con etanol, las enzimas que metabolizan el metanol contenidas en los peroxisomas son eliminadas a través de la macropexofagia, mientras que si el medio con metanol se sustituye por otro con glucosa se induce la micropexofagia, que ocurre de forma dependiente de síntesis de proteínas (Brown & Chiang, 2009; Tuttle & Dunn, 1995). Por ejemplo, durante la micropexofagia es necesaria la expresión de Vac8, una proteína específica de la membrana vacuolar que permite la formación de la membrana que secuestra los peroxisomas y los dirige hacia la vacuola (Fry *et al.*, 2006).

Mientras que se conoce bien en levaduras que la privación de nitrógeno induce la autofagia mediante la inactivación de TOR, los efectos de la privación de glucosa son más controvertidos. Se sabe que en presencia de glucosa se inhibe la expresión de la proteína Snf1 (homólogo en levaduras de AMPK), que activa la autofagia a través de las proteínas autofágicas Atg1 y Atg13 (Wang *et al.*, 2001). Se han identificado también en levaduras otras proteínas que parecen estar implicadas en la activación de la autofagia, como Ras2 (Jiang *et al.*, 1998), Gpr1 y Gpa2 (Nazarko *et al.*, 2008b) o Pho85p (Chen & Klionsky, 2011). Además, la glucosa puede inducir en levaduras el ensamblaje de la V-ATPasa y con esto favorecer la autofagia (Kane, 2006).

Lo expuesto hasta el momento apoyaría que la glucosa en levaduras induce la autofagia. Sin embargo, experimentos más recientes han mostrado que la glucosa podría también producir una inhibición de la autofagia. Por ejemplo, cuando *S. cerevisiae* se mantiene en un medio rico en nutrientes (nitrógeno y glucosa), la proteína PKA y la quinasa TORC1, fosforilan de forma independiente a Atg13, lo que impide la formación del complejo Atg1-Atg13-Atg17 y, por tanto, se inhibe la autofagia (Stephan *et al.*, 2009). Es posible que en la inhibición de la autofagia en levaduras, TORC1 responda principalmente a los niveles de nitrógeno, mientras que la respuesta a los niveles de carbono ocurra vía PKA (Stephan *et al.*, 2010), para inhibir la autofagia cuando estos son elevados, y vía Snf1p, para activar la autofagia cuando ocurre lo contrario.

En resumen, en levaduras se ha descrito que la glucosa puede tanto inducir como inhibir la autofagia. Es posible que la glucosa induzca la autofagia durante una fase adaptativa inicial para poder eliminar enzimas u orgánulos, como la fructosa-1,6-bisfosfatasa y los peroxisomas, que son superfluos, y que después la inhiba para prevenir una autodigestión innecesaria de la célula. Este último paso en la regulación de la autofagia ocurriría en levaduras principalmente a través de PKA, pero también de TORC1. En cuanto a la privación de glucosa en estos mismos organismos, el efecto principal producido sería una activación de la autofagia vía Snf1p, que conviene señalar aquí que es el homólogo de AMPK.

1.2.2.2. Regulación de la autofagia por glucosa en células de mamífero

Como hemos explicado anteriormente, la autofagia es un proceso altamente regulado por factores ambientales tanto en levaduras como en células de mamífero. Durante los últimos años se ha estudiado extensamente el efecto de los aminoácidos sobre la autofagia. Sin embargo, el papel de la glucosa es mucho menos conocido, a pesar de que se ha descrito una posible implicación de la autofagia en enfermedades como la diabetes o distintos tipos de cáncer en las que la glucosa desempeña un papel relevante.

En mamíferos, se induce la producción y secreción de glucagón (por las células α del páncreas) o de insulina (por las células β) en respuesta a los niveles bajos o elevados de glucosa en sangre, respectivamente. El glucagón activa la autofagia en el hígado mientras que la insulina la inhibe. Al mantener ratones en ayuno, la insulina alcanza su nivel más bajo después de 24 h, mientras que los niveles de glucagón se elevan ya desde las primeras horas del tratamiento y

los niveles más elevados de autofagia coinciden con esos tiempos entre 0 y 24 h (Ezaki *et al.*, 2011). Es decir, durante el ayuno la autofagia se induce tanto porque la insulina deja de ejercer su papel represor como porque el glucagón la estimula. Cuando a continuación se proporciona glucosa a los ratones en ayuno se produce el efecto contrario y se inhibe la autofagia que había sido previamente inducida por el ayuno (Ezaki *et al.*, 2011).

Aparte de la regulación de la autofagia por la insulina y por el glucagón, la glucosa podría también modular la autofagia independientemente de estas hormonas, principalmente debido a su papel como factor clave en el estado energético de la célula y también por la posibilidad de producir estrés oxidativo y acumulación de ROS (especies reactivas de oxígeno).

Al igual que en levaduras, en las células de mamífero la glucosa también promueve el ensamblaje de la V-ATPasa, vía PI3K (Sautin *et al.*, 2005), favoreciendo la acidificación de los lisosomas necesaria para la actividad de las hidrolasas lisosomales. Aunque no se conoce con detalle la vía de señalización que regula el ensamblaje de V-ATPasa, se ha descartado la participación de Akt y de p70S6K (Sautin *et al.*, 2005). Como la actividad de la V-ATPasa favorece la degradación lisosomal y este último proceso es un paso tardío en la autofagia, los datos sugieren un papel inductor de la glucosa sobre la autofagia. Sin embargo, son pocos los trabajos que han establecido que la glucosa incrementa la autofagia, probablemente porque el concepto clásico es que la disponibilidad de nutrientes reduce la autofagia y al revés. Por ejemplo, Ravikumar *et al.* (2003) mostraron que la glucosa induce la autofagia a través de la inhibición de mTORC1. Además, se ha descrito también que la trehalosa, un disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa, activa la autofagia, como se demostró por un incremento de la degradación de agregados de huntingtina y de α -sinucleína (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2010; Sarkar *et al.*, 2007; Casarejos *et al.*, 2011).

En contraste con estos datos, la mayoría de los investigadores consideran que en células de mamífero la glucosa inhibe la autofagia (Maruyama *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2009; Hariharan *et al.*, 2010; Kobayashi *et al.*, 2012) en concordancia con lo que ocurre a nivel hormonal (ver arriba). Así, se ha descrito que cuando ocurre un descenso de la energía en células incubadas en un medio libre de glucosa se activa la autofagia como un mecanismo dirigido a restaurar los niveles de ATP (Singh & Cuervo, 2011). Esta caída en la energía resulta en un incremento en la relación AMP/ATP, que es detectado por la enzima AMPK y que induce la autofagia (Kim *et al.*, 2011b) por diferentes mecanismos que serán descritos a continuación. Por el contrario, otros autores concluyen que la disminución de ATP no es necesaria para la

inducción de la autofagia por la privación de glucosa, sino que también puede deberse al estrés del retículo endoplásmico (Xi *et al.*, 2011). Aunque el tratamiento con 2-deoxi-D-glucosa reduce el contenido de ATP intracelular y activa a AMPK, el tratamiento con manosa reduce el estrés del retículo endoplásmico sin afectar a los niveles de ATP, recuperándose la homeostasis celular y disminuyendo los niveles de LC3-II (Xi *et al.*, 2011). Es decir, la manosa reduce la autofagia, independientemente del ATP, disminuyendo el estrés del retículo endoplásmico.

Por otro lado, tanto la privación como una elevada concentración de glucosa pueden llevar a un incremento de ROS, con la consiguiente inducción del estrés del retículo y, con ello, de la autofagia (Marambio *et al.*, 2010; Younce & Kolattukudy, 2010; Wang *et al.*, 2011). La producción de ROS ocurre normalmente como consecuencia de la fosforilación oxidativa mitocondrial y un incremento importante de los niveles de ROS puede causar daños en el DNA y en las proteínas y más específicamente en componentes mitocondriales. Para evitar esto, la célula puede inducir la autofagia como mecanismo citoprotector (Kanki *et al.*, 2011) a través de una vía dependiente de Beclin-1. En condiciones normales, Beclin-1 se encuentra inactivo formando un complejo con Bcl-2. Al aumentar los niveles de ROS, Bcl-2 se ubiquitina y se degrada a través de la vía ubiquitina-proteasomas, de forma que Beclin-1 queda libre y aumenta la autofagia. Por el contrario, se ha descrito que el ayuno aumenta los niveles de peróxido de hidrógeno, lo que produce la oxidación e inhibición de la proteasa Atg4 de forma que no puede delipidar LC3-II de la fosfatidiletanolamina de la membrana de los autofagosomas y se impide que la proteína LC3 se recicle para ser de nuevo utilizada e inducir la autofagia (Essick & Sam, 2010). Es decir, aunque en general se considera que los niveles elevados de ROS inducen la autofagia, en determinadas condiciones también pueden tener un efecto negativo sobre este proceso.

1.3. VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADORAS DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

En los siguientes apartados vamos a exponer las diferentes vías de señalización por las que la glucosa regula la autofagia en células de mamífero. A pesar de la importancia de PKA en la regulación de la autofagia en levaduras, su papel en células de mamífero no parece ser relevante como veremos después. Mencionaremos también que algunas de las proteínas implicadas en esa regulación, tales como AMPK, p53 o p27Kip1, inducen la autofagia cuando

los niveles de ATP descienden en ausencia de glucosa. Otro efecto que describiremos, debido tanto a altas como a bajas concentraciones de glucosa, es el aumento de los niveles de ROS con la consiguiente activación de las MAPK p38, ERK (quinasa regulada por señales extracelulares) o JNK, que actuarían aquí aumentando la autofagia. Finalmente, haremos referencia al posible papel de IKK (quinasa de I κ B) y FoxO (“forkhead box” clase O) en la inducción de la autofagia por glucosa, que aparentemente ocurre sin relación con los niveles de ATP o de ROS. Es decir, el hecho que la autofagia dependiente de glucosa pueda ser regulada tanto por el estrés energético como por el estrés oxidativo, e incluso de forma independiente de estos dos factores, refleja la amplia variedad de vías de señalización reguladoras de autofagia por este nutriente.

1.3.1. AUTOFAGIA DEPENDIENTE DE ENERGÍA

La glucosa es una importante e inmediata fuente de energía y AMPK es un sensor energético que se activa por una caída en los niveles de ATP como ocurre cuando hay privación de glucosa (Hardie, 2011).

La relación de AMPK con la autofagia se define como un activador de este proceso a través de la inhibición de mTORC1 (Matsui *et al.*, 2007) o por la fosforilación directa de Ulk1 (Kim *et al.*, 2011b; Egan *et al.*, 2011). AMPK puede además inducir la autofagia activando otras vías de señalización como p53 (Duan *et al.*, 2011) o p27Kip1 (Liang *et al.*, 2007). Así encontramos, en medio de toda esta complicada red que regula la autofagia, que AMPK actuaría como núcleo de diferentes vías de señalización que regulan la autofagia dependiente de glucosa. Para una mejor comprensión de las diferentes vías que regulan la autofagia a partir de la activación de AMPK durante la privación de glucosa, se representa un esquema en la FIGURA 6.

1.3.1.1. AMPK/mTORC1

En condiciones en las que disminuyen los niveles de ATP, AMPK colabora en el mantenimiento de la homeostasis celular induciendo procesos catabólicos que producen energía e inhibiendo procesos biosintéticos que consumen ATP (Hardie *et al.*, 2012). AMPK es una quinasa formada por tres subunidades (α , β y γ). AMPK α tiene un dominio serina/treonina quinasa y un dominio regulador que interacciona con las subunidades β y γ . AMPK β tiene un dominio de unión al glucógeno y AMPK γ contiene dos dominios CBS (Cistationina- β sintasa) de unión a nucleótidos.

Una molécula de AMP se puede unir a un dominio CBS, lo que produce un cambio conformacional que permite su fosforilación en la Thr172 por LKB1 (quinasa hepática B1) (Hawley *et al.*, 2003) o por CaMKK β (quinasa 1- α de la quinasa dependiente de calcio/calmodulina) (Woods *et al.*, 2005) e impide su desfosforilación por la proteína fosfatasa 2Ca (Suter *et al.*, 2006).

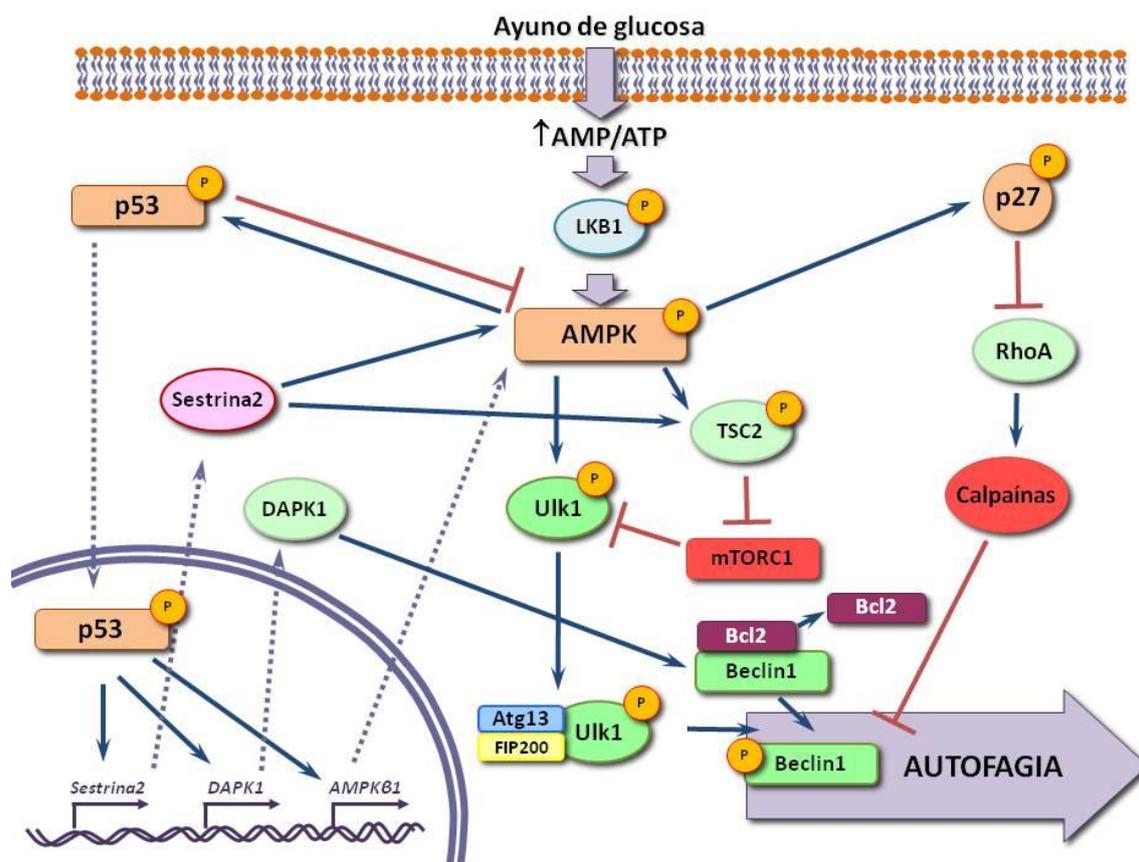


FIGURA 6. Función de las vías dependientes de energía sobre la regulación de la autofagia.

La privación de glucosa aumenta la relación AMP/ATP y, como consecuencia, se activa AMPK. AMPK regula la autofagia a través de la fosforilación directa de Ulk1 y TSC2. Una vez fosforilada, Ulk1 forma un complejo con Atg13 y FIP200 y se induce la autofagia. Por otro lado, TSC2 inhibe mTORC1, cuya función puede impedir la fosforilación de Ulk1 por AMPK. AMPK también regula la autofagia por la fosforilación de p53 y p27Kip1 en condiciones de privación de glucosa. p53 en el citosol inhibe la autofagia, en cambio, la fosforilación de p53 en hSer15 lleva a su translocación al núcleo e induce la expresión de los genes *Sestrina2*, *DAPK1* y *AMPKβ1*. *Sestrina2* activa AMPK y TSC2, y *DAPK1* fosforila a Beclin1, lo que induce la autofagia en ambos casos. Finalmente, p27Kip1 también induce la autofagia al inhibir RhoA, un inhibidor de Beclin1, a través de la activación de las calpaínas que degradan a Beclin1.

AMPK activa la autofagia a través de la fosforilación de TSC2, que a su vez inhibe indirectamente, a través de Rheb, al represor de la autofagia mTORC1 (Shaw *et al.*, 2004a). En células MEF (fibroblasto embrionario de ratón) *TSC2*^{-/-}, donde AMPK no puede inhibir a

mTORC1, la autofagia se encuentra inhibida, mientras que la inhibición de mTORC1 con rapamicina incrementa la autofagia (Choo *et al.*, 2010). Se ha establecido la existencia de una competición entre AMPK y mTORC1 por la fosforilación de Ulk1 (Kim *et al.*, 2011b; Egan *et al.*, 2011). En condiciones de privación de glucosa, AMPK fosforila Ulk1 en los residuos Ser317 y Ser777 induciendo la autofagia y se reduce la fosforilación en la Ser757, que es diana del inhibidor de la autofagia mTORC1. En los MEFs *TSC1/2^{-/-}* o cuando se sobreexpresa Rheb, condiciones en las que mTORC1 muestra mayor actividad, se induce la fosforilación de Ulk1 en la Ser757, lo que rompe la interacción AMPK/Ulk1 y se inhibe la autofagia (Kim *et al.*, 2011b). Finalmente, la privación de glucosa produce la acumulación del inhibidor de mTORC1, DEPTOR, lo que induce también la autofagia (Zhao *et al.*, 2011).

Conviene señalar también que algunos resultados contradictorios acerca del efecto de AMPK sobre la autofagia se han obtenido con el uso de compuestos reguladores de la actividad de AMPK, como AICAR (5-aminoimidazol-4-carboxamida-1- β -D-ribofuranosido) o el Componente C. Sin embargo, estos compuestos pueden influir sobre la autofagia de forma independiente de AMPK (Meijer & Codogno, 2007). Por ejemplo, AICAR, considerado un activador de AMPK, inhibe la autofagia al bloquear la interacción entre PI3K de clase III y Beclin1 (Viana *et al.*, 2008). En el caso del Componente C, considerado un inhibidor de AMPK, se ha observado que en células cancerosas en lugar de inhibirse la autofagia se activa al suprimir este compuesto la vía PI3K/Akt-mTORC1 de forma independiente de AMPK (Vuvincevic *et al.*, 2011).

1.3.1.2. p53

La privación de glucosa resulta en la fosforilación del factor de transcripción p53 en Ser15 (Ser18 en ratones) por AMPK (Jones *et al.*, 2005; Feng *et al.*, 2007). Esto se observó en células H1299 de ratón expresando un dominante negativo de AMPK, ya que cuando se incuban en condiciones de baja glucosa (0,5 mM) no se produce la fosforilación de p53 en la Ser18 (Jones *et al.*, 2005). No obstante, otras quinasas pueden también fosforilar a p53 en esa serina en un medio libre de glucosa (Williams *et al.*, 2009). La fosforilación de p53 en la Ser15 confiere a la proteína una mayor estabilidad, debido a que previene su ubiquitinación y su posterior degradación en los proteasomas (Shieh *et al.*, 1997). En células WI-38 HDF incubadas en condiciones de baja concentración de glucosa se activa la vía ATM/AMPK/p53, que incrementa la expresión del activador transcripcional IFI16 e induce la autofagia (Duan *et al.*, 2011). Además, se ha descrito que la fosforilación de p53 produce la inhibición de mTORC1 y la inducción de la autofagia (Feng *et al.*, 2007) a través de un mecanismo que implica la

translocación de p53 al núcleo (Lee *et al.*, 2009). En el núcleo, p53 induce la expresión de diferentes genes implicados en la autofagia como *Sestrina2* y *DAPK1*. La *Sestrina2* activa a AMPK, que induce la fosforilación de TSC2 e inhibe mTORC1 (Budanov & Karin, 2008). Por su parte, *DAPK1* fosforila a Beclin1 de modo que previene la formación del complejo Beclin1/Bcl-2 que inhibe la autofagia (Zalckvar *et al.*, 2009). Por tanto, en ambos casos se produce una activación de la autofagia que derivaría de una baja concentración de glucosa. Otros genes inductores de la autofagia que también son regulados por la actividad de p53 son *AMPK β 1* (Feng *et al.*, 2007), *DRAM* y *TSC2* (Maiuri *et al.*, 2010; Morselli *et al.*, 2011).

El hecho de que bajo condiciones de privación de glucosa AMPK fosforile a p53 e induzca su translocación al núcleo y que, a su vez, AMPK sea activado por las dianas de p53 sugiere la existencia de un bucle de retroalimentación positiva entre p53 y AMPK. p53 juega un papel importante en la autofagia, no solo en el núcleo como factor de transcripción, sino también en el citosol. En esa localización, p53 ejerce un papel negativo en la autofagia a través de una menor expresión de Beclin1 o debido a una activación constitutiva de la vía PI3K/Akt, ya que se observa una menor fosforilación de AMPK y TSC2 y una mayor activación de mTOR (Fabbro & Henderson, 2003; Tasdemir *et al.*, 2008).

En resumen, la activación de p53 por fosforilación depende de AMPK, que responde positivamente a la privación de glucosa. La fosforilación de p53 induce su translocación al núcleo donde induce la expresión de genes para proteínas activadoras de AMPK e inductoras de la autofagia. Por tanto, la estimulación de la autofagia en respuesta a la privación de glucosa también puede ocurrir a través de p53.

1.3.1.3. p27Kip1

p27Kip1 es un inhibidor de las Cdks (quinasas dependientes de ciclinas). Concretamente se une a la ciclina D e inhibe la actividad catalítica de Cdk4, por lo que detiene el ciclo celular en la fase G₁. Esta proteína es relevante aquí porque, además de su papel en la regulación del ciclo celular, se ha descrito que induce la autofagia bajo condiciones de privación de glucosa, ya que el aumento del número de vacuolas autofágicas observado tras una incubación prolongada en medio sin glucosa en células MEF *p27Kip1^{+/+}* no se observa en MEF *p27Kip1^{-/-}* (Liang *et al.*, 2007). Además, la expresión ectópica de un mutante de p27Kip1 fosfomimético (p27Kip1^{T198D}) es suficiente para inducir la autofagia (Liang *et al.*, 2007).

La privación de la glucosa incrementa la fosforilación (en los residuos Ser83, Thr170 y mThr197/hThr198) de p27Kip1 a través de la vía LKB1/AMPK (Liang *et al.*, 2007; Short *et al.*, 2008). De hecho, durante la privación de glucosa en células HeLa que no expresan LKB1 se observan niveles reducidos tanto de la forma fosforilada como de la proteína p27Kip1 total (Liang *et al.*, 2007). Esta fosforilación de p27Kip1 por AMPK determina su localización celular, que es preferentemente citosólica. La p27Kip1 fosforilada queda secuestrada en el citosol por las proteínas 14-3-3, lo que previene su unión a la proteína Importina- α , responsable de su transporte al núcleo (Besson *et al.*, 2008). En células que expresan una forma de AMPK constitutivamente activa se observa que solamente un 10 % de p27Kip1 permanece en el núcleo. Por el contrario, si se expresa un dominante negativo de AMPK, alrededor de un 70 % de p27Kip1 queda retenida en el núcleo (Short *et al.*, 2008).

La expresión de p27Kip1 también está regulada por la disponibilidad de glucosa. La privación de glucosa induce su expresión, mientras que la presencia de glucosa la reduce (Eto, 2011). Existe, por el contrario, un trabajo que muestra que en condiciones de privación de glucosa p27Kip1 es ubiquitinada por el complejo E3 ligasa SIAH/SIP y que consecuentemente es degradada por proteasomas (Nagano *et al.*, 2011). Aunque esta degradación de p27Kip1 se ha asociado con un descenso en la motilidad celular, no se ha estudiado su efecto sobre la autofagia.

El mecanismo preciso por el que la proteína p27Kip1 fosforilada en el citosol activa la autofagia no se conoce. Es posible que se deba a que p27Kip1 previene la activación de la GTPasa RhoA (Besson *et al.*, 2008; Hoshino *et al.*, 2009), ya que se sabe que esta GTPasa induce la activación de las calpaínas implicadas en la degradación de Beclin1 (Yoo *et al.*, 2010), por lo que en esas condiciones Beclin1 podría ejercer su función de activación de la autofagia.

1.3.2. VÍAS DEPENDIENTES DEL ESTRÉS OXIDATIVO

El incremento de los niveles de ROS ocurre cuando aumenta el transporte electrónico en las mitocondrias y puede suceder tanto por la ausencia como por elevadas concentraciones de glucosa (Liu *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 2006). Esta acumulación de ROS puede ir acompañada por la estimulación de la autofagia, por ejemplo, en miocitos del corazón de ratas recién nacidas la privación de glucosa causa un descenso de los niveles de la molécula antioxidante glutatión, lo que genera un incremento en los niveles de ROS y, por tanto, la activación de la autofagia (Marambio *et al.*, 2010). Al parecer, la inducción de la autofagia por el incremento en los

niveles de ROS se debe a la activación de AMPK o de las tres principales proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK), JNK, ERK o p38. Debido a que el papel de AMPK ha sido descrito más arriba, en los siguientes apartados nos centraremos en las tres MAPK que, tal y como se representa en la FIGURA 7, se activan por un incremento de los niveles de ROS durante el ayuno de glucosa o en condiciones de hiperglucemia.

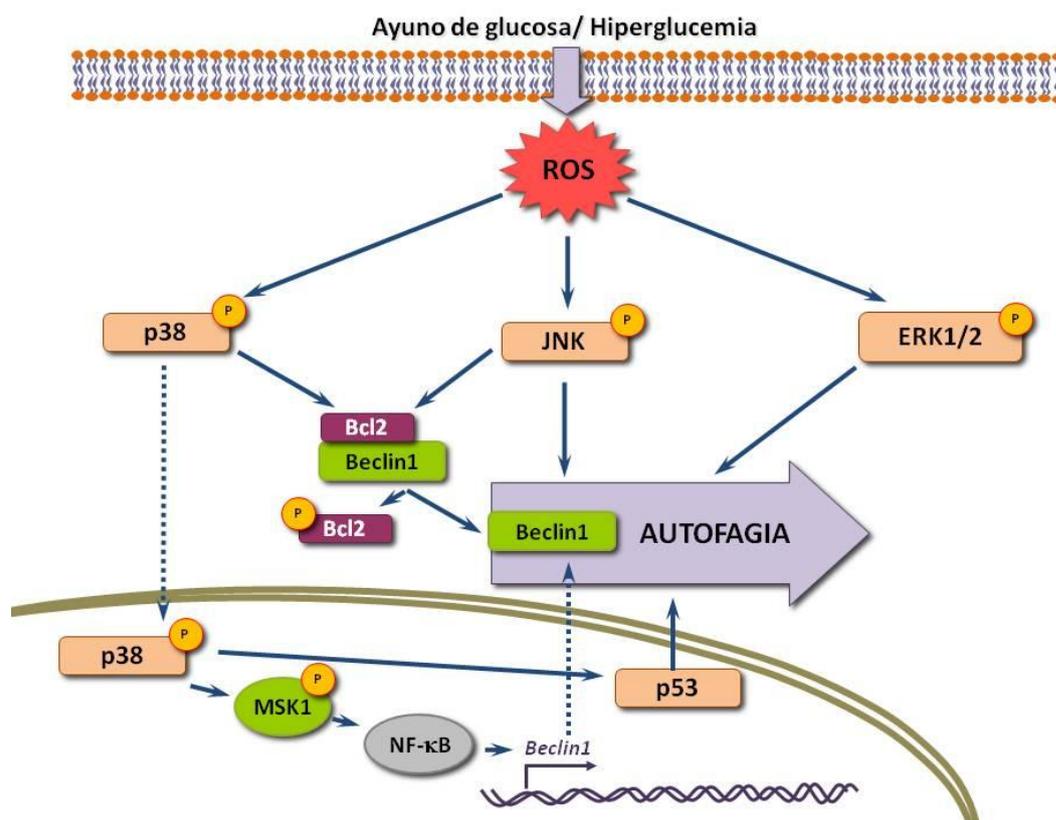


FIGURA 7. Regulación de la autofagia por vías dependientes de estrés oxidativo.

Tanto la hiperglucemia como la privación de glucosa incrementan los niveles de ROS en las células. Este incremento puede llevar a la inducción de la autofagia a través de las MAPK p38, JNK o ERK. En el caso de la MAPK p38, esta puede inducir la autofagia a través de dos mecanismos. Primero, p38 fosforila Bcl-2, lo que rompe el complejo Bcl-2/Beclin1 que inhibe la autofagia. Segundo, p38 puede translocar al núcleo, donde activa a p53 y, a través de la quinasa MSK1, a NF-κB, ambos activadores de la autofagia. Además, JNK también puede fosforilar a Bcl-2 e impedir la formación del complejo Bcl-2/Beclin1 que no deja iniciar la autofagia. Finalmente, ERK puede activar la autofagia a través de TSC1/2.

La familia de las MAPK conforma una amplísima variedad de proteínas que incluyen a las serina-treonina quinasa ERK, JNK y p38. La activación de las MAPK ocurre por una doble fosforilación en los residuos de Thr y Tyr en la secuencia Thr-X-Tyr, donde X corresponde a un aminoácido determinado según la subfamilia. Por ejemplo, las proteínas ERK son fosforiladas

en la secuencia Thr-Glu-Tyr, mientras que en JNK y p38 las secuencias son Thr-Pro-Tyr y Thr-Gly-Tyr, respectivamente.

A continuación se expone brevemente la función de estas quinasas respecto a la regulación de la autofagia relacionada con la disponibilidad de glucosa.

1.3.2.1. JNK

Una consecuencia del estrés oxidativo inducido por una elevada concentración de glucosa o por su privación es el aumento de la expresión y activación de JNK (Tsai *et al.*, 2012; Song & Lee, 2005). En presencia de una alta concentración de glucosa, la vía JNK puede confluir con la vía ERK/p53 (Yan *et al.*, 2011), o con la vía NF- κ B (Tsai *et al.*, 2012) que veremos más adelante, para regular la autofagia. Por otro lado, en condiciones de baja concentración de glucosa, JNK puede activarse e inducir la autofagia de forma dependiente de K-RAS (Kim *et al.*, 2011a). Aunque no se conoce en detalle cómo ocurre la regulación de la autofagia por JNK durante la privación de glucosa, sí existen datos referidos a la privación de nutrientes en general. En estas condiciones, JNK regula la autofagia por fosforilación de Bcl-2 en los residuos de Thr69, Ser70 y Ser87, permitiendo que se disocie de Beclin1 para que ocurra la autofagia (Wei *et al.*, 2008). Es probable que algo similar ocurra en la privación de glucosa, pero esto no se sabe todavía.

1.3.2.2. ERK

ERK1/2 es considerado también un activador de la autofagia (Wang *et al.*, 2009; Sivaprasad & Basu, 2008). En ausencia de aminoácidos, ERK1/2 puede inducir la autofagia a través de una proteína G trimérica (Ogier-Denis *et al.*, 2000) o del módulo no canónico MEK/ERK cascada abajo de AMPK y cascada arriba de TSC1/2 y mTORC1 (Wang *et al.*, 2009). Por el contrario, la activación sostenida de ERK, producida por ejemplo con el carcinógeno Lindane, tiene el efecto opuesto, de forma que se produce una inhibición en la maduración de los autofagosomas (Corcelle *et al.*, 2006). En las ratas diabéticas Goto-Kakizaki se ha demostrado una relación directa entre la disponibilidad de glucosa, la activación de ERK y la autofagia. En esas ratas, el estrés oxidativo asociado a la hiperglucemia induce la autofagia a través de la activación de la vía ROS-ERK/JNK-p53 (Yan *et al.*, 2011).

1.3.2.3. p38

Una vez que la MAPK p38 se ha activado por un aumento de los niveles de ROS o por estrés de retículo endoplásmico, la acción de p38 sobre la autofagia ocurre a través de la fosforilación de Bcl-2 (de Chiara *et al.*, 2006) que permite la liberación de Beclin1 del complejo Bcl-2/Beclin1 para iniciar la autofagia. p38 también puede activar la autofagia al translocarse al núcleo y fosforilar a la quinasa MSK1/2 que activa tanto a NF- κ B como a p53 (Cuadrado & Nebreda, 2010), también implicadas en la regulación positiva de la autofagia (Liu *et al.*, 2009).

Estos datos apuntan hacia un papel estimulador de p38 sobre la autofagia. Sin embargo, también se ha mostrado que esta quinasa puede actuar como inhibidora de la autofagia. Por ejemplo, durante la privación de glucosa se induce la fosforilación de p38, lo que incrementa su afinidad con la proteína p38IP (proteína que interactúa con p38) y reduce la formación del complejo p38IP/Atg9 que es necesario para la formación de los autofagosomas (Webber & Tooze, 2010). Sin embargo, la mayoría de los estudios que atribuyen a p38 un papel inhibidor de la autofagia están basados en investigaciones en las que se han usado inhibidores de esa quinasa, como SB203580 o SB202190 (Comes *et al.*, 2007; Thyagarajan *et al.*, 2010; Haussinger *et al.*, 1999), y que, según resultados recientes, inducen efectivamente la formación de vacuolas autofágicas pero de una manera independiente de p38 (Menon *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012).

1.3.3. OTRAS VÍAS

Además de las vías de señalización implicadas en la regulación de la autofagia en respuesta a los cambios energéticos y a la inducción de ROS en relación a la glucosa, existen otras vías de señalización que implican a NF- κ B, Sirtuína1 y FoxO y que se representan esquemáticamente en la FIGURA 8.

1.3.3.1. IKK/NF- κ B

Aunque la relación directa entre la disponibilidad de glucosa, la inducción de NF- κ B y su efecto sobre la autofagia no ha sido descrita, los datos disponibles hasta el momento sugieren un posible papel de NF- κ B en la autofagia inducida por glucosa.

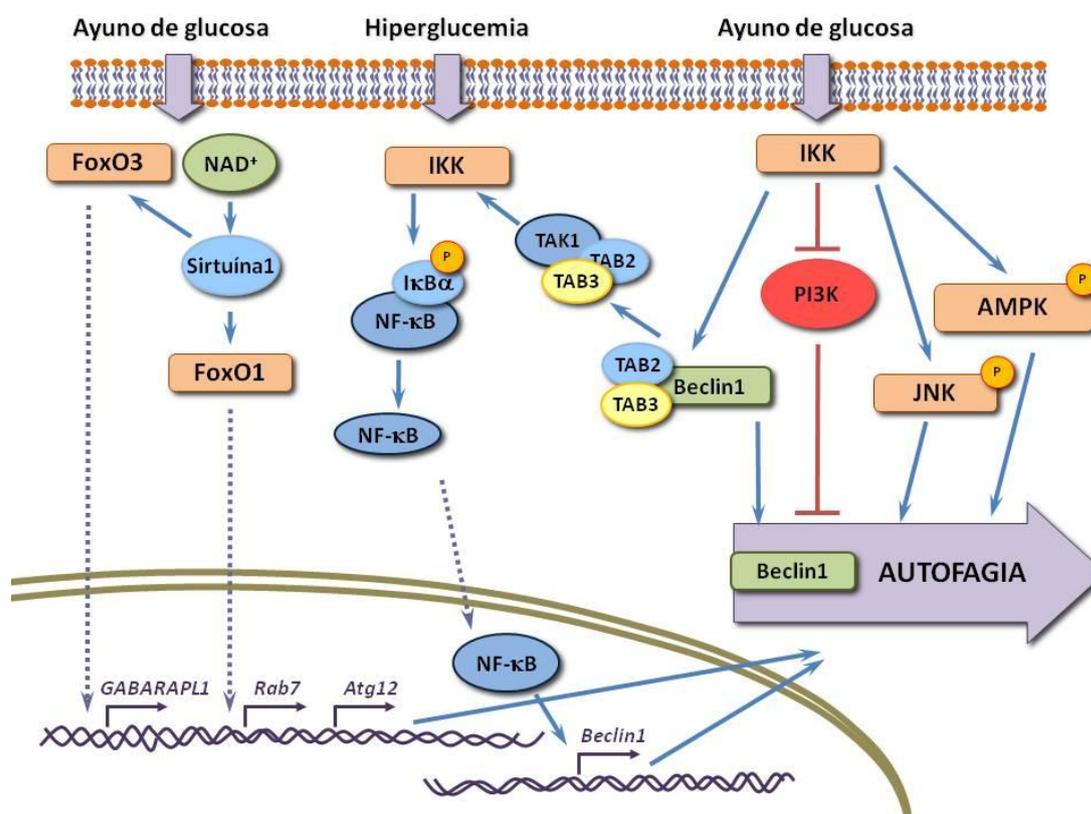


FIGURA 8. Otras vías implicadas en la regulación de la autofagia por glucosa.

La autofagia puede ser también activada por la vía IKK/NF-κB. La hiperglucemia produce una activación de IKK que fosforila a IκBα, quedando de esta forma NF-κB libre. Así, NF-κB transloca al núcleo donde induce la expresión del gen *Beclin1*, cuyo producto es necesario para activar la autofagia. La privación de glucosa también activa IKK, lo que puede inducir la autofagia independientemente de NF-κB por tres vías diferentes. Primero, IKK puede fosforilar directamente a AMPK o JNK. Segundo, IKK inhibe PI3K, evitando el efecto negativo sobre la autofagia. Y tercero, IKK favorece la disociación de las proteínas TAB2 y TAB3 del complejo que forman con Beclin1. Por una parte, esto permite que Beclin1 quede libre y active la autofagia, y por otra, que TAB2 y TAB3, junto con TAK1, activen IKK, que también activa la autofagia. La privación de glucosa también puede estimular la autofagia a través de FoxO1 y FoxO3, que inducen la expresión de los genes *GABARAPL1* y de *Rab7* y *Atg12*, respectivamente.

Existe una correlación positiva entre la actividad de NF-κB y la autofagia, principalmente a nivel de Beclin1. El ayuno produce la disociación de Beclin1 de las proteínas TAB2 y TAB3 (proteína de unión 2 y 3 a TAK (quinasa activada por el factor β de crecimiento transformante)). Esto permite, a la vez, que la autofagia sea inducida por Beclin1, que TAB2/TAB3 activen a TAK1 y que esta active a IKK (Criollo *et al.*, 2011), que es un activador del factor de transcripción NF-κB, lo que induce la expresión de Beclin1, LC3 y Atg5, tres proteínas importantes en la activación de la autofagia. La activación de la autofagia por IKK puede ocurrir a través de la fosforilación de JNK1 y de AMPK (Criollo *et al.*, 2010). IKK puede también fosforilar en Ser690 a

la subunidad p85 reguladora de PI3K, inhibiendo de esta forma la vía PI3K/Akt y suprimiendo su papel inhibitor sobre la autofagia (Comb *et al.*, 2012).

En condiciones de hiperglucemia se activa IKK, lo que conduce a la fosforilación de I κ B α y a su degradación por los proteasomas. De esta forma NF- κ B queda libre de I κ B α (Ramana *et al.*, 2004). También se ha mostrado que una alta concentración de glucosa produce una activación de NF- κ B acoplada con una translocación al núcleo del heterodímero p65/p50 de NF- κ B (Chen *et al.*, 2011b) que, como se ha comentado más arriba, induce la expresión de genes activadores de autofagia.

1.3.3.2. Sirtuína1 Y FoxO

La privación de glucosa puede inducir la autofagia vía Sirtuína1/FoxO1/3. La Sirtuína1 es una deacetilasa dependiente de NAD⁺ que, en condiciones de ayuno de nutrientes (medio HBSS), deacetila a las proteínas Atg5, Atg7 y Atg8 para inducir la autofagia (Lee *et al.*, 2008). En condiciones de privación de suero y de glucosa se induce la expresión de la Sirtuína1, que deacetila FoxO1 y FoxO3 (Hariharan *et al.*, 2010; Sengupta *et al.*, 2009), que una vez deacetiladas se translocan al núcleo e inducen la expresión de los genes *Rab7* (que codifica una GTPasa implicada en la fusión de los autofagosomas con endosomas y lisosomas) (Hariharan N, 2010), *GABARAPL1*, (que codifica una proteína similar a la ubiquitina y que puede formar parte del sistema de conjugación de LC3), *LC3* y *Atg12* (que codifica una proteína que participa en la elongación de las vacuolas autofágicas), lo que lleva finalmente a la inducción de la autofagia (Sengupta *et al.*, 2009).

1.4. IMPLICACIONES PATOLÓGICAS DE LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

El conocimiento detallado de los mecanismos mediante los que la glucosa regula la autofagia tiene también importancia en patología, debido a la posible implicación de esa regulación en numerosas enfermedades, particularmente en cáncer y en aquellas en las que se produce una desregulación en el metabolismo de la glucosa, como la diabetes.

Así, en los tumores avanzados, las células cancerosas sobreviven y crecen en microambientes pobres en nutrientes, donde la disponibilidad de glucosa, y por tanto el contenido energético, son limitantes. En estas condiciones se produce un incremento de la autofagia que resulta

esencial para la supervivencia de las células, ya que al proporcionar energía ayuda a mantener la homeostasis celular. En estas circunstancias se piensa que la inducción de la autofagia se produce vía AMPK, p53 o JNK (Esteve & Knecht, 2011). De hecho, en muestras de hepatoma humano en los que existe una menor captación de glucosa y que presentan una elevada expresión del oncogen K-RAS y una activación de JNK se observan niveles elevados de LC3-II y se favorece la supervivencia celular (Kim *et al.*, 2011a).

En el caso de la diabetes, por el contrario, las células están sometidas a condiciones de hiperglucemia. El ambiente hiperglucémico conduce a una mayor producción de ROS, a la disfunción mitocondrial y al estrés del retículo endoplásmico que causa un mal plegamiento de las proteínas y la formación de agregados, por ejemplo en las células β del páncreas (Nakatani *et al.*, 2005). En esas condiciones, un incremento de la autofagia favorece el mantenimiento de la estructura, la masa y la función de las células, ya que ayuda a degradar estos agregados que no pueden ser eliminados por los proteasomas al ser demasiado grandes. Si la autofagia se inhibe, puede observarse un incremento en la actividad de la caspasa-3, reduciéndose la supervivencia de las células (Han *et al.*, 2010), así como un aumento del estrés oxidativo. Además, la hiperglucemia puede originar enfermedades cardiovasculares. En este tipo de patologías, la autofagia está alterada y conduce a un aumento de la formación de placas ateroscleróticas que suele reducirse al inducir la actividad autofágica que elimina orgánulos dañados (Gonzalez *et al.*, 2011).

Aunque la autofagia puede tener un papel citoprotector durante la hiperglucemia, un aumento excesivo de la autofagia puede reducir la masa mitocondrial con implicaciones negativas. Esto ocurre en ratas diabéticas con una autofagia hiperestimulada cuya inhibición permite la recuperación de la actividad mitocondrial (Yan *et al.*, 2011). El estrés del retículo endoplásmico originado por hiperglucemia causa una activación sostenida de JNK1, implicada en el desarrollo de la obesidad y en la resistencia a la insulina, que finalmente sobreestimulan la autofagia. La inhibición de esta quinasa reduce la hiperglucemia y mejora la sensibilidad a la insulina (Kaneto *et al.*, 2004).

Los pacientes diabéticos presentan también mayor riesgo de daño cardíaco por isquemia/reperfusión (Luitse *et al.*, 2012). Durante la isquemia, se produce una reducción en la cantidad de sangre que llega a los tejidos y a los órganos, lo que implica un menor aporte de oxígeno y de glucosa a las células. Esto produce un aumento de la autofagia dependiente de AMPK, Rheb/mTORC1 y Sirtuina1/FoxO3 (Sciarretta *et al.*, 2012). Por otra parte, la formación de los autofagosomas durante la reperfusión ocurre independientemente de AMPK y de la

inhibición de mTORC1, pero sí por un incremento de los niveles de Beclin1. Sin embargo, la sobreactivación de la autofagia durante la reperfusión puede causar la muerte celular (Matsui *et al.*, 2007) que puede ser aliviada, reduciendo así el daño cardíaco, con un inhibidor de la autofagia (Buss *et al.*, 2009).

1.5. CONCLUSIÓN

En resumen, la degradación de proteínas intracelular en general, y la autofagia en particular, están altamente reguladas por múltiples factores, muchos de ellos relacionados con el estrés oxidativo, nutricional y energético. Por ejemplo, el ayuno de nutrientes es un potente estímulo de la autofagia como se ha puesto de manifiesto en el caso de los aminoácidos. No obstante, aún existe controversia en cuanto al efecto de la privación de otro nutriente, la glucosa. En general, y como se ha resumido arriba, la mayor parte de los datos apoyan un papel de la glucosa como activadora de la autofagia en levaduras, mientras que ocurre lo contrario en células de mamífero, aunque desde luego existen excepciones en uno y otro caso. Por otro lado, la regulación de la autofagia por glucosa se puede relacionar con la quinasa AMPK que actúa como sensor energético de la célula e induce la autofagia a través de la inhibición de mTORC1 o también con la activación de otras proteínas, como p53 o p27Kip1. Sin embargo, las MAPK JNK, ERK1/2 y p38, entre otras, son también activadoras de la autofagia independientemente de AMPK y en relación o no con la producción de ROS y podrían estar igualmente implicadas en esa regulación. Los datos expuestos indican pues la elevada complejidad existente en la regulación de la autofagia por glucosa y la necesidad, por tanto, de aportar nuevos resultados y conclusiones sobre la misma. Estos datos no sólo pueden ser útiles para comprender mejor la regulación de un proceso tan esencial para las células como es la autofagia, sino que también pueden tener implicaciones para mejorar la comprensión y el tratamiento de patologías muy importantes, como se ha comentado más arriba.

En esta tesis doctoral nos hemos planteado, en primer lugar reevaluar en células de mamífero el efecto de la glucosa sobre la degradación de proteínas, más concretamente sobre la vía autofágica, aunque hemos considerado también su posible relevancia para la vía ubiquitina-proteasomas. En segundo lugar, hemos analizado si el ayuno de glucosa implica un estrés celular, ya sea energético u oxidativo. Finalmente, hemos estudiado si en la vía de señalización que regula la autofagia dependiente de glucosa intervienen las principales quinasas

reguladoras de la autofagia, es decir AMPK y mTORC1, o por el contrario depende de una vía de señalización diferente.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En la actualidad, el objetivo general de nuestro laboratorio se dirige a investigar la regulación de los principales mecanismos de degradación intracelular de proteínas, así como las posibles alteraciones en su funcionamiento que ocurren en enfermedades raras. En cuanto al primer aspecto del objetivo general, esa regulación, que es enormemente compleja, se refiere sobre todo al proceso de la macroautofagia (a la que suele referirse simplemente como autofagia), ya que se trata de un mecanismo de degradación intracelular de proteínas cuya actividad en las células varía de manera muy acusada en respuesta a la situación ambiental en la que estas se encuentran. Sin embargo, en el laboratorio también se estudia la regulación de otros mecanismos de degradación intracelular de proteínas, como la vía ubiquitina-proteasomas. Es dentro de ese primer aspecto del objetivo general mencionado arriba donde se encuadran los objetivos específicos de esta tesis doctoral, que aborda la regulación de la degradación intracelular de proteínas por la glucosa, empleando como modelo de estudio varias líneas celulares de mamífero. Concretamente, esta tesis propone dos objetivos principales:

1. Investigar los efectos de la glucosa sobre la actividad de las principales vías de degradación intracelular de proteínas, en particular la macroautofagia, pero también la vía ubiquitina-proteasomas.

Para abordar este objetivo, se ha estudiado, en primer lugar, cómo la glucosa afecta a la macroautofagia mediante diferentes procedimientos que incluyen la cuantificación de la formación de autofagosomas y de los niveles de vacuolas autofágicas, la determinación de los niveles de lisosomas y el cálculo de la contribución de la macroautofagia a la degradación intracelular de proteínas. Dentro de este primer objetivo, se ha analizado, en segundo lugar, el efecto de la glucosa sobre las dos fases principales que operan en la degradación intracelular de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasomas: la poliubiquitinación de los sustratos, detectando los niveles de proteínas poliubiquitinadas, especialmente cuando la actividad proteolítica de los proteasomas está inhibida, y la actividad catalítica de los proteasomas, determinando la actividad proteolítica más relevante en la degradación intracelular de proteínas de estos complejos multienzimáticos, la actividad similar a la quimotripsina.

2. Identificar los mecanismos y vías de señalización implicadas en la regulación de la macroautofagia por la glucosa.

Una vez establecida, en el apartado anterior, la existencia de una regulación de la macroautofagia por la glucosa, se planteó averiguar cómo se producía esta. Para ello se analizó, en primer lugar, el efecto que tenía la presencia o la ausencia de glucosa sobre dos aspectos relacionados con la homeostasis celular, así como cuál era la relación de estos con la actividad macroautofágica. Se investigó, por una parte, el papel del balance energético a través de la determinación del ATP intracelular y, por otro, el del estrés oxidativo a través de la detección de los niveles de especies reactivas de oxígeno. En segundo lugar, se trató de identificar las vías de señalización que intervienen en esa regulación. Esto se hizo, inicialmente, mediante el uso de inhibidores de varias quinasas cuya implicación en la regulación de la macroautofagia se ha descrito, para, después, tratar de confirmar esos resultados mediante ARNs interferentes (siRNAs) específicos de la quinasa identificada y mediante el uso de fibroblastos embrionarios de ratones “knockout”, en los que el gen que codifica esa quinasa estuviese inactivado.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. LÍNEAS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO

Se han utilizado las siguientes líneas celulares:

- **NIH/3T3**: fibroblastos embrionarios de ratón (*Mus musculus*)
- **NIH/3T3-GFP-LC3**: células NIH/3T3 que expresan de forma estable la proteína LC3 fusionada con GFP (proteína verde fluorescente).
- **HEK293T**: células embrionarias de riñón humanas (*Homo sapiens*)
- **HeLa**: células epiteliales procedentes de un adenocarcinoma cervical (*Homo sapiens*)
- **MEFs $p38^{+/+}$ y $p38^{-/-}$** : fibroblastos embrionarios de ratón derivados, respectivamente, de ratones “wild-type” y “knockout” para la proteína p38 (*Mus musculus*).

Las células NIH/3T3, HEK293T y HeLa se obtuvieron de la European Collection of Animal Cell Cultures (Salisbury, UK). Para obtener las células NIH/3T3-GFP-LC3, las células NIH/3T3 se transfectaron con el plásmido eGFP-LC3, cedido por el Dr. Tamotsu Yoshimori (Departamento de Genética, Universidad de Osaka, Japón). Las células NIH/3T3-GFP-LC3 transformadas de forma estable fueron seleccionadas con geneticina (Gibco, 1 mg/mL). Los MEFs $p38^{+/+}$ y $p38^{-/-}$ fueron cedidos por el Dr. Ángel Nebreda (IRB, Barcelona, España).

Todas las células se mantuvieron en DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.), suplementado con 10 % (v/v) de FBS (suero bobino fetal), penicilina (100 U/mL) y estreptomina (100 mg/mL), todo procedente de Gibco Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, EE.UU.). El medio de cultivo de los MEFs se suplementó con 2-mercaptoetanol al 0,02 %. Para mantener la selección, se añadió geneticina (1 mg/mL) al medio de cultivo de las células NIH/3T3-GFP-LC3.

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C en una estufa de CO₂ TC2323 Shel Lab. de Sheldon Manufacturing Inc. (Cornelius, OR, EE.UU.), bajo una atmósfera de 5 % CO₂ y 80 % de

humedad relativa. Todo el trabajo con cultivos celulares se realizó en una campana de flujo laminar Bio II A de Telstar Industrial (Terrassa, España).

Para la realización de los diferentes experimentos, las células se tripsinizaron y se determinó su número por unidad de volumen utilizando un hemocitómetro Bürker. Para la mayoría de los experimentos, se sembraron $1 \cdot 10^6$ células en placas de Petri de 60 mm de diámetro.

Para la inducción de la autofagia, las células fueron lavadas con PBS (tampón fosfato salino) y se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Según se indica en cada experimento, al medio de Krebs-Henseleit se le añadió, o no, D(+)-glucosa a las concentraciones indicadas, procedente de VWR Merck (Radnor, PA, EE.UU.), una mezcla de aminoácidos esenciales de Gibco Invitrogen Co. o distintos inhibidores que se especifican en el apartado 3.1.2.2.

3.1.2. REACTIVOS

3.1.2.1. Compuestos químicos

A continuación se enumeran, por orden alfabético, los principales productos que componen los diferentes tampones y soluciones utilizados en este trabajo y su procedencia.

Los productos procedentes de la casa comercial VWR Merck fueron: acetato de uranilo, acetona, ácido dietilbarbitúrico, ácido tricloroacético, amonio peroxidisulfato, CaCl_2 , $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, desoxicolato de sodio, fosfotungstato sódico, glicerol, KCl, KH_2PO_4 , L-valina, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, NaF, NaHCO_3 , NaOH, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, sacarosa, tartrato sódico-potásico y Tris (Tris-hidroximetil-aminometano).

De la casa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU): 2-mercaptoetanol, ATP-Mg, azida sódica, azul de bromofenol, citrato trisódico, CuSO_4 , DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro), reactivo de Folin-Ciocalteau, glicerol, MgCl_2 , Na_3VO_4 , N-Suc-LLVY-MCA (N-Succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-4-metil-coumaril-7-amida), PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo), rojo Ponceau y tetróxido de osmio.

Finalmente, los productos que proceden de casas comerciales diferentes a las anteriores fueron los siguientes: cacodilato sódico de Scharlau (Barcelona, España), ditiotreitól y SDS (dodecilsulfato de sodio) de USB (Cleveland, OH, EE.UU.), Epon-8/12 y glutaraldehído de Polyscience (Niles, IL, EE.UU.), FURA2-AM (FURA2-acetometil éster) de Invitrogen, glicina de

Roche (Monza, Italia), HCl y NaOH de Fisher Scientific-Afora (Barcelona, España), HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'-etanesulfónico) de Serva (Heidelberg, Alemania), L-[3,4(n)-³H]-valina de Amersham GE Healthcare (Buckinghamshire, Reino Unido), Lysotracker Red DND-99 de Molecular Probes (Carlsbad, CA, EE.UU.) y poliacrilamida de Amresco Inc. (Solon, OH, Estados Unidos).

3.1.2.2. Inhibidores

Los inhibidores de la actividad de diferentes quinasas, las moléculas empleadas como inhibidores de las vías proteolíticas y las que actúan sobre otras dianas se enumeran en la TABLA I (ver Anexos).

3.1.2.3. Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados, su procedencia y la dilución empleada se resumen en la TABLA II y TABLA III (ver Anexos).

3.1.3. TAMPONES Y OTRAS SOLUCIONES

Los principales tampones y soluciones usados en este trabajo fueron:

Medio de Krebs-Henseleit: NaCl 118,4 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,19 mM, MgSO₄·7H₂O 2,54 mM, CaCl₂·2H₂O 2,44 mM, NaHCO₃ 18,5 mM, glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, ajustado a pH 7,4.

Solución de "stripping": glicina 0,2 M, SDS 0,1 % y Tween-20 al 1 %, ajustado a pH 2,3.

Solución de fijación A para microscopia electrónica: cacodilato sódico 0,1 M, formaldehído 2 %, glutaraldehído 2,5 %, sacarosa 0,1 M, MgCl₂ 0,1 % y CaCl₂ 0,05 %, ajustado a pH 7,3.

Solución de fijación B para microscopia electrónica: tetróxido de osmio 1 %, ácido dietilbarbitúrico 0,1 M y sacarosa 0,1 M, ajustado a pH 7,3.

Solución de Ringer: NaCl 150 mM, KCl 5 mM y CaCl₂ 2 mM.

Solución de Lowry A: Na₂CO₃ 20 mg/mL y NaOH 4 mg/mL.

Solución de Lowry B: tartrato sódico-potásico 10 mg/mL y CuSO₄ 5 mg/mL.

Tampón de carga para SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida): Tris-HCl 62,5 mM, glicerol 10 %, SDS 2,5 %, 2-mercaptoetanol 5 % y azul de bromofenol 0,001 %, ajustado a pH 6,8.

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 %, pH 8,3.

Tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas: Tris-HCl 50 mM, NaCl 10 mM, Nonidet P-40 1 %, glicerol 15 %, Na₃VO₄ 2 mM, NaF 100 mM, leupeptina 100 μM y PMSF 1 mM, ajustado a pH 7,8.

Tampón de transferencia: Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 136,9 mM, Na₂HPO₄·2H₂O 16 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM y KCl 2,68 mM, ajustado a pH 7,2-7,4.

Tampón HBS: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,3.

Tampón para la determinación de la actividad de proteasomas: HEPES 50 mM, EDTA 5 mM, ditioneitol 1 mM, ATP·Mg 1 mM y glicerol 10 %, pH 7,8.

Tampón RIPA: Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, Nonidet P-40 1 %, desoxicolato de sodio 0,5 %, leupeptina 100 μM y PMSF 1 mM, ajustado a pH 7,8.

Tampón Tris salino (TBS): Tris 50 mM y NaCl 150 mM, ajustado a pH 7,4.

TBS-Tween: Tris 50 mM, NaCl 150 mM y Tween 0,05 %, ajustado a pH 7,4.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS

3.2.1.1. Obtención de extractos celulares

Para obtener los extractos celulares, se lavaron las células con PBS, se añadió tampón de lisis para la detección de proteínas fosforiladas o tampón RIPA y las células se recogieron con un

“rubber-policeman” en tubos de 1,5 mL en hielo. A continuación, las muestras se sometieron a 8-10 ciclos de congelación-descongelación, vorteadando cada vez. Posteriormente, estas se centrifugaron a 10.000 g durante 10 min a 4°C para separar el sedimento (restos de membranas celulares) del sobrenadante que contiene las proteínas para analizar.

3.2.1.2. Cuantificación de la concentración de proteína

La cantidad de proteína en los extractos celulares se analizó utilizando el kit BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, IL, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante, o por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Este último es un método colorimétrico basado en la reducción de los grupos fenólicos de las proteínas. En primer lugar, se añade a la muestra una mezcla de las soluciones A y B (ver apartado 3.1.3) en una proporción 1:1 (v/v) y se incuba durante 10 min. La solución A alcaliniza el medio mientras que la solución B contiene Cu^{2+} que forma complejos con los enlaces peptídicos, lo que produce un cambio conformacional en las proteínas de manera que se exponen los grupos fenólicos de las tirosinas y triptófanos de las proteínas presentes. A continuación, se añade la solución Folin-Ciocalteu 0,07 N durante 30 min. Esta solución vira del color amarillo al azul al reducirse el ácido fosfomolibdotúngstico contenido en la solución Folin-Ciocalteu por la presencia de los fenoles. La cantidad de proteínas en la muestra se mide por la absorbancia a 750 nm, que se midió en un espectrofotómetro UV-Visible Heλios de Unicam (Cambridge, Reino Unido), con referencia a un patrón de proteínas.

3.2.1.3. SDS-PAGE, transferencia electroforética e inmunodetección en membrana (“Western-blot”)

La cantidad de proteína de los extractos celulares añadida en cada pocillo del gel fue idéntica para todas las muestras y podía variar, dependiendo del experimento, entre 40 y 60 µg. Los extractos se diluyeron en tampón de carga y se hirvieron durante 10 min a 95°C. Las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida (Amresco. Inc) en presencia de SDS (SDS-PAGE). El porcentaje de acrilamida varió entre el 10 % y el 16 % en función del peso molecular de la proteína de interés. Los geles se montaron sobre soportes verticales Mighty Small de Hoefer (San Francisco, CA, EE. UU.) y se sometieron a un voltaje continuo de 150 V. En todos los geles se utilizaron marcadores de peso molecular de Invitrogen (Benchmark pre-stained protein ladder).

Una vez separadas las proteínas por su peso molecular, se transfirieron a una membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno, Amersham) en un tanque de transferencia húmeda (Bio-Rad Lab., Berkeley, CA, EE.UU) con un tampón compuesto por Tris 25 mM y glicina 192 mM, pH 8,3. Las transferencias se realizaron a un voltaje constante de 30 V durante 16 horas a 4°C. Después, las membranas se lavaron y se tiñeron con rojo Ponceau para comprobar la correcta transferencia de las proteínas. Después de lavarlas con TBS-Tween, las membranas se bloquearon con leche desnatada en polvo disuelta en PBS al 5 % durante 1 h y se volvieron a lavar con TBS-Tween. Posteriormente, se incubaron durante 16 h a 4°C con los anticuerpos primarios diluïdos en TBS, que contenía también BSA (seroalbúmina bovina) al 1 % y azida sódica al 0,05 %. A continuación, las membranas se lavaron dos veces con TBS-Tween y otras dos con TBS durante 10 min cada vez y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario dirigido contra la inmunoglobulina correspondiente (de conejo, ratón o rata) conjugado con HRP (peroxidasa de rábano). La dilución del anticuerpo secundario, en TBS y leche desnatada al 2 %, varió entre 1:5.000 y 1:7.000 (v/v). Para eliminar los restos de anticuerpo secundario que no se había unido a las proteínas de interés, las membranas se volvieron a lavar con TBS-Tween y con TBS durante 10 min cada lavado.

La detección de las proteínas en las membranas se realizó por quimioluminiscencia, utilizando Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche) o, para señales más débiles, ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (Amersham GE Healthcare). Las bandas inmunoreactivas fueron visualizadas, tras el revelado, en películas Kodak X-Ray de Carestream Health, Inc. (Rochester, NY, EE.UU.).

Para la detección de más de una proteína en la misma membrana de PVDF se realizó un “stripping” con la solución descrita en el apartado 3.1.3 durante 10 min, tras lo que se lavó la membrana varias veces con TBS, se volvió a bloquear con leche desnatada al 5 % y se incubó con los anticuerpos correspondientes.

3.2.2. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE AUTOFAGIA

3.2.2.1. Cuantificación de vacuolas autofágicas por microscopia electrónica

Para el estudio de las vacuolas autofágicas mediante microscopia electrónica, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min. A continuación se fijaron durante 2 h a 4°C con la solución de fijación A (glutaraldehído y formaldehído), tras lo que se lavaron tres

veces con la misma solución sin los fijadores durante 12 h a 4°C. Seguidamente, se realizó una segunda fijación, incubando las células en la solución de fijación B durante 45 min a 4°C y en oscuridad. Finalizada la fijación, las células se lavaron en la solución de Ringer durante 30 min. La deshidratación de las células fijadas se realizó en concentraciones crecientes de acetona. En primer lugar, las muestras se incubaron en acetona al 50 % durante 15 min. Seguidamente, se realizó una incubación de 2-4 h en una solución de acetona al 70 % conteniendo acetato de uranilo al 0,5 % y fosfotungstato sódico al 1 %. Las últimas incubaciones se realizaron durante 15 min con acetona al 95 % y, finalmente, con acetona al 100 %. Por último, se realizó la infiltración en mezclas de acetona:Epon (Serva) y, después, la inclusión de la muestra en resina Epon dentro de cápsulas de gelatina que se incubaron en la estufa a 60°C durante 48 h. Tras la polimerización de la resina, se realizaron cortes ultrafinos (500-700 Å) utilizando un ultramicrotomo LKB 4801A (Leica Cambridge, Cambridge, Reino Unido). Las secciones ultrafinas obtenidas fueron montadas en rejillas de cobre (EMscope Lab, Ashford, Reino Unido), se trataron durante 1 min aproximadamente con citrato de plomo (preparado a partir de citrato trisódico 120 mM y nitrato de plomo 78 mM, como se describe en Reynolds (1963)) para proporcionar un mayor contraste y se observaron en un microscopio electrónico de transmisión CM-10 (Philips, Eindhoven, Holanda).

Las estructuras autofágicas se identificaron sobre micrografías electrónicas (18 x 24 cm) con un aumento de 16.400 veces en base a los criterios morfológicos descritos anteriormente (Knecht *et al.*, 1984; Esteban *et al.*, 2007). Brevemente, las vacuolas autofágicas tipo Avi, similares a un autofagosoma presentan una membrana doble o simple que atrapan en su interior orgánulos identificables sin degradar, mientras que las vacuolas tipo Avd que esencialmente corresponden a un autolisosoma encierran en una membrana sencilla restos de orgánulos parcialmente degradados.

3.2.2.2. Análisis de la actividad autofágica con el marcador GFP-LC3

Este análisis se realizó por microscopía de fluorescencia utilizando células NIH/3T3-GFP-LC3 que expresan de forma estable la proteína LC3 fusionada con GFP en su extremo amino terminal (GFP-LC3). De este modo, al producirse la unión de LC3 a la membrana del autofagosoma en forma de LC3-II se observan en la célula agregados de GFP que se visualizan como puntos. Estos puntos verdes se pueden cuantificar para dar una valoración de la cantidad de autofagosomas que se han formado. Brevemente, las células NIH/3T3-GFP-LC3 se

sembraron en placas de 60 mm de diámetro sobre cubreobjetos redondos. Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con FBS, antibióticos y geneticina (1 mg/mL). Cuando las células alcanzaron una confluencia aproximada del 50 %, se lavaron con PBS, se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min y, posteriormente, se añadió, o no, glucosa (10 mM) y se incubaron 2 h más. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído (4 %) durante 20 min a temperatura ambiente. Se retiró el fijador, se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron con DAPI (1 µg/mL) durante 5 min. Tras varios lavados, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con el líquido de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem). Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss Observe Z1 (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

3.2.2.3. Cuantificación de la degradación de proteínas mediante experimentos de pulso y caza

Para determinar la cantidad de proteína degradada, las células se sembraron en placas de seis pocillos y se incubaron en medio DMEM suplementado con FBS, antibióticos y L-[3,4(n)-³H]-valina (2 µCi/mL) durante 24 h (pulso), hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 60 %. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron y se incubaron durante 24 h en medio DMEM suplementado con FBS, antibióticos y L-valina 10 mM, para permitir la degradación de las proteínas de vida media corta marcadas y para evitar la reutilización de la valina radiactiva por las células. A continuación, las células se lavaron con PBS suplementado con L-valina (10 mM) y se incubaron durante 2 h en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa en presencia de L-valina 10 mM. Los distintos tratamientos se realizaron según corresponde a cada experimento. A diferentes tiempos (1 h, 2,5 h y 4 h), se recogieron muestras de 0,5 mL del medio de incubación (cazas), a las que se añadió BSA (4 mg/mL) para facilitar la precipitación de las proteínas. Estas se precipitaron añadiendo 0,5 mL de ácido tricloroacético del 10 % a 4°C, mientras se vortearon los tubos y tras 10 min a la misma temperatura se centrifugaron a 3.500 g durante 10 min. Los precipitados se lavaron con ácido tricloroacético al 5 % y se disolvieron en NaOH (0,2 N). Se recogieron también las células de cada placa, añadiendo primero 10 ml de ácido tricloroacético del 10 % a 4°C durante 30 min y después 2 ml de NaOH (0,2 N) y desoxicolato de sodio (0,4 %) durante 24 h a 4°C. A cada muestra se añadió líquido de centelleo OptiPhase (PerkinElmer, Waltham, MA, EE.UU.) y la radiactividad emitida se midió en un contador de centelleo líquido Tri-Carb 3100 TR (PerkinElmer). Para los cálculos de la degradación de proteínas, se considera la radiactividad inicial en las células como la suma de la

radiactividad final contenida en las células y la radiactividad total liberada al medio extracelular durante las cazas. El porcentaje de la proteína degradada se calcula como la radiactividad liberada al medio durante una hora respecto a la radiactividad inicial. Finalmente, la proteína degradada por autofagia se determina por la diferencia de los porcentajes de la proteína degradada en el tratamiento control (sin inhibidores) y en presencia de 3-metiladenina (que corresponde a la proteína degradada por vías diferentes a la macroautofagia).

3.2.2.4. Medida de la masa lisosomal

Para medir el contenido en lisosomas de las células (masa lisosomal), estas se sembraron en placas de 12 pocillos y se incubaron en medio DMEM suplementado con FBS y antibióticos hasta que alcanzaron una confluencia aproximada del 80 %. Tras realizar una incubación previa de 30 min en medio de Krebs-Henseleit carente de glucosa, se añadió glucosa (10 mM) y/o aminoácidos y se incubaron 2 h más. Durante los últimos 20 min de incubación se añadió el marcador fluorogénico LysoTracker Red DND-99 a una concentración final de 50 nM. A continuación, las células se lavaron con PBS frío y se fijaron con paraformaldehído al 2 % durante 10 min. Después de lavar las células con PBS, se midió la fluorescencia del LysoTracker Red (λ_{ex} : 544 nm; λ_{em} : 590 nm) con un lector de placas M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Las células se volvieron a lavar, se incubaron con DAPI (300 nM diluido en PBS) durante 5 min para marcar los núcleos, se realizaron varios lavados con PBS y se midió la fluorescencia del DAPI (λ_{ex} 358; λ_{em} 461 nm). Finalmente, para referir los datos al contenido celular de las muestras, los valores obtenidos con el LysoTracker Red se dividieron por los obtenidos con DAPI.

3.2.2.5. Análisis de los niveles celulares de LC3-II

Estos niveles se analizaron mediante “Western-blot”. Para valorar correctamente la formación de vacuolas autofágicas en un tiempo determinado es necesario inhibir la degradación de proteínas por los lisosomas, ya que la proteína LC3-II se degrada durante la autofagia. Para ello, en los distintos tratamientos se incluyeron los inhibidores leupeptina (100 μ M) y NH_4Cl (20 mM) que inhiben las serina y cisteína proteasas y aumentan el pH lisosomal necesario para el correcto funcionamiento de las hidrolasas lisosomales, respectivamente. Finalizada la

incubación, las células se recogieron en tampón RIPA y se procedió a su análisis según se describe en el apartado 3.2.1.3. Debido a la inestabilidad de la forma lipídica de LC3 (LC3-II), las muestras fueron procesadas inmediatamente para analizarlas por “Western-blot” o se diluyeron en el tampón de carga y se guardaron a -80°C hasta su uso. Para garantizar la correcta separación de las proteínas LC3-I (18 kDa) y LC3-II (16 kDa), la electroforesis se realizó en geles de acrilamida al 16 % de 10 x 10,5 cm bajo un voltaje constante de 150 V, durante aproximadamente 3 h.

3.2.3. ESTUDIO DE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS

3.2.3.1. Niveles de proteína poliubiquitinadas

Para analizar la cantidad de proteínas poliubiquitinadas fue necesario inhibir la actividad de los proteasomas con el fin de evitar que fueran degradadas, para lo que se utilizó el inhibidor MG132 (N-benziloxycarbonilo-leucina-leucina-leucina aldehído) a una concentración de 50 µM. Las células se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa en presencia de MG132 durante 30 min. Posteriormente se añadió o no glucosa y se incubaron durante 2 h más. Transcurrido este tiempo, las células se recogieron en tampón RIPA y se procesaron por “Western-blot” con los anticuerpos correspondientes como se indica en el apartado 3.2.1.3.

3.2.3.2. Medida de la actividad de los proteasomas

La actividad similar a quimotripsina es la más relevante de las tres actividades de los proteasomas en la degradación intracelular de proteínas (Kisselev & Goldberg, 2005). Para determinarla, se sembraron células NIH/3T3 en placas de 60 mm de diámetro. Una vez alcanzada una confluencia cercana al 90 %, las células se lavaron con PBS, se incubaron en medio de Krebs-Henseleit durante 30 min y, posteriormente, se añadió, o no, glucosa 10 mM. Tras 2 h de incubación, los extractos celulares se recogieron en el tampón para la determinación de la actividad de los proteasomas y se sometieron a 8-10 ciclos de congelación-descongelación, vorteando las muestras entre cada ciclo. Los restos celulares se separaron del sobrenadante por centrifugación a 10.000 g durante 10 min a 4°C. Una vez recogido el sobrenadante, se determinó la concentración de proteína en cada muestra por el método de Lowry (ver apartado 3.2.1.2.).

La medida de la actividad similar a quimotripsina de los proteasomas se llevó a cabo en 10 µg de muestra, a los que se añadió N-Suc-LLVY-MCA 50 µM y ATP·Mg 1 mM. Los proteasomas reconocen la secuencia LLVY del N-Suc-LLVY-MCA de forma que se libera el grupo MCA que, en esas condiciones, emite fluorescencia. Como control negativo del ensayo se utilizó el inhibidor de los proteasomas lactacistina a una concentración de 10 µM. La cinética de la reacción fue medida en un fluorímetro SpectraMax M5 (Molecular Devices) durante 1 h (λ_{ex} : 380 nm; λ_{em} : 460 nm). Las unidades de fluorescencia obtenidas se refirieron a la cantidad de proteína.

3.2.4. SILENCIAMIENTO DE LA MAPK p38 MEDIANTE RNAs DE INTERFERENCIA

Para el silenciamiento de p38 en células NIH/3T3, se utilizaron siRNAs (MAPK p38 ON-Target plus smart pool L-040125) procedentes de Dharmacon (Lafayette, CO, EE.UU.). Como control negativo se utilizó un siRNA inespecífico (siRNA-NT, ON-Target plus control pool D-001810), también de Dharmacon. Para llevar a cabo el silenciamiento, se sembraron 130.000 células en placas de 12 pocillos y, al día siguiente, se transfectaron con 100 nM del siRNA de p38 o del siRNA-NT, utilizando el agente de transfección DharmaFECT-1 en medio DMEM libre de suero. Tras 48 h de incubación, las células se tripsinizaron y se sembraron de nuevo en placas de 6 pocillos. Transcurridas 24 h, se llevaron a cabo los experimentos en presencia o ausencia de glucosa en las células silenciadas. Para comprobar la eficacia del silenciamiento, se analizó la cantidad de p38 en los extractos celulares mediante “Western-blot”.

3.2.5. INMUNOFLUORESCENCIA

Las células se sembraron en placas de 60 mm de diámetro sobre cubreobjetos redondos en medio DMEM suplementado con FBS y antibióticos. Todos los experimentos se realizaron con las células en una confluencia inferior al 50 %. Las células se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min y, posteriormente, se añadió, o no, glucosa a una concentración de 10 mM durante 2 h. Finalizado este tiempo, las células se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min a temperatura ambiente y se volvieron a lavar tres veces con PBS. Las células se trataron con NH_4Cl (75 mM) y glicina (20 mM) durante 10 min para bloquear los grupos aldehído del fijador y evitar la fluorescencia causada por estos y, tras varios lavados, se permeabilizaron con BSA al 1 % y Tritón X-100 al 0,2 % durante 1 h a

25°C. Los cubreobjetos se incubaron durante 16 h a 4°C con un anticuerpo que reconoce la proteína p38 total o fosforilada (1:200) generados en ratón y que iba disuelto en BSA al 1 % y Triton X-100 al 0,05 %. Tras cuatro lavados en PBS de 5 min cada uno se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario que reconoce inmunoglobulinas de ratón conjugado con el fluorocromo Alexa 594 (1:100) durante 1 h a 25°C. Una vez finalizada la incubación, las células se lavaron en PBS cuatro veces más, se incubaron durante 5 min con DAPI (1 µg/mL) para el marcaje de los núcleos y se montaron sobre portaobjetos utilizando el líquido de montaje FluorSave Reagent (Calbiochem).

Una vez que se obtuvieron las preparaciones, estas se visualizaron en un microscopio Zeiss Observer Z1 (Carl Zeiss) equipado con Apotome y las fotografías digitales se tomaron con una cámara AxioCam MRm (Carl Zeiss).

3.2.6. MEDIDA DE LOS NIVELES DE ROS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Para la determinación de los niveles de ROS, se sembraron $3 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de seis pocillos y se mantuvieron durante 24 h en medio DMEM suplementado con FBS y antibióticos. Las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 30 min en medio de Krebs-Henseleit y, posteriormente, se incubaron otras 2 h en medio de Krebs-Henseleit con, o sin, glucosa (10 mM) o en medio DMEM con FBS y antibióticos. Como control positivo se añadió, durante los últimos 10 min de incubación, el inductor de estrés oxidativo plumbagina a una concentración de 2 µg/mL. Una vez terminada la incubación, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron a 500 g y se resuspendieron en 0,5 mL del mismo medio en el que habían sido incubadas. Para medir el peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, las muestras se incubaron durante 20 min, respectivamente, con dihidrorodamina y dihidroetidio a una concentración de 2,5 µM. Las células marcadas de este modo se analizaron mediante citometría de flujo empleando un citómetro Cytomics FC500 (Beckman Coulter, Pasadena, CA, EE.UU). La oxidación de la dihidrorodamina por el peróxido de hidrógeno y la oxidación del dihidroetidio por el superóxido permite que cuando las moléculas son excitadas a 488 nm, se emita fluorescencia a una longitud de onda de 525 ± 20 nm (FL1) en el caso de la dihidrorodamina y de 620 ± 20 nm (FL3) en el caso del dihidroetidio. El número de eventos adquiridos durante cada ensayo fue de 10.000.

3.2.7. MEDIDA DE LA CONCENTRACIÓN DEL ATP INTRACELULAR

Para la cuantificación de los niveles de ATP intracelular se utilizó el kit ATP-Assay de Roche que se basa en la emisión de luz al oxidarse la luciferina por la enzima luciferasa. Esta reacción es dependiente de ATP, que es proporcionado por las células. Para ello, las células se sembraron en placas de 12 pocillos de forma que en 24 h alcanzaron aproximadamente el 50 % de confluencia. Se lavaron con PBS y se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min, tras lo que se añadieron diferentes concentraciones de glucosa (1-10 mM) o de oxamato de sodio (5-100 mM). Después de 2 h de incubación, las células se lavaron con PBS frío y se recogieron en el tampón proporcionado por el fabricante. Una vez resuspendidas, las células se lisaron utilizando el tampón de lisis comercial. A continuación se añadió la mezcla luciferasa-luciferina proporcionada por el kit en una proporción 1:1 (v:v) y la luminiscencia emitida se midió inmediatamente en un lector de placas M5 (Molecular Devices). El contenido proteico de cada muestra se determinó por el método de Lowry y los valores relativos de luminiscencia se refirieron a la cantidad de proteína de cada extracto.

3.2.8. MEDIDA DE LOS NIVELES DE CALCIO

El calcio intracelular puede determinarse con FURA2, una molécula con gran afinidad por este catión y que cambia de conformación dependiendo de si se encuentra en forma libre o unida al mismo. El FURA2 tiene un máximo de emisión a una longitud de onda de 510 nm. En su forma unida al calcio se excita a una longitud de onda de 340 nm y en su forma libre se excita a una de 380 nm. En estos estudios utilizamos el derivado FURA2-AM, ya que las células son permeables a este compuesto, mientras que el FURA2 no puede entrar en las células. Una vez en el interior de la célula, el grupo acetometilo (AM) es separado por esterasas celulares, de forma que se deja libre la molécula de FURA2. El proceso seguido aquí fue, brevemente, el siguiente: se sembraron células NIH/3T3 en placas de Petri sobre cubreobjetos redondos de 25 mm de diámetro y previamente esterilizados con luz UV y tratados con gelatina porcina tipo A al 0,2 % para favorecer la adherencia de las células a su superficie. Una vez alcanzada una confluencia aproximada del 60 %, las células se lavaron con PBS y se incubaron en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 1 h junto con FURA2-AM a una concentración de 5 μ M. El cubreobjetos se montó sobre una cámara de inmersión acoplada a un microscopio de fluorescencia Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss). Las células se mantuvieron inmersas en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa mientras se excitaba el fluoróforo a una longitud de onda de 340 y

de 380 nm alternadamente. La fluorescencia emitida a una longitud de onda de 510 nm se recogía a intervalos de tiempo definidos (5 s), con una cámara digital acoplada al microscopio, mientras el medio en el que previamente estaban incubadas las células se retiraba y era sustituido por el medio de Krebs-Henseleit fresco con o sin glucosa. La relación entre la fluorescencia emitida al excitar la molécula con una longitud de onda de 340 nm respecto a la fluorescencia emitida tras excitar con una longitud de onda de 380 nm (relación 340/380) se analizó con el programa Hamamatsu Analyst (Hamamatsu, Shizuoka, Japón). Como control positivo las células se trataron con ionomicina (1 μ M), que permite la entrada masiva de calcio al interior de las células, y como control negativo se usó el quelante de calcio EGTA (8 mM).

3.2.9. CUANTIFICACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR

Este parámetro se determinó mediante un doble marcaje con anexina A5-FITC y yoduro de propidio. La anexina A5 se une a la fosfatidilserina de la membrana celular, que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática. Sin embargo, en células apoptóticas, aunque se mantiene la integridad de la membrana, la fosfatidilserina se transloca a la parte externa de la membrana, de forma que la anexina A5 es capaz ahora de unirse a ella. Por otro lado, en apoptosis tardía, o bien en necrosis, se pierde la integridad de la membrana, lo que permite que el yoduro de propidio (que no puede atravesar la membrana de células intactas) penetre en el interior de la célula y marque el ADN. Debido a esta pérdida de integridad de la membrana, la anexina A5 también puede unirse a la fosfatidilserina de la membrana plasmática. De esta manera, el doble marcaje con anexina A5 y yoduro de propidio permite distinguir entre células intactas, apoptóticas tempranas o apoptóticas tardías/necróticas.

Para cuantificar la viabilidad celular se sembraron $6 \cdot 10^5$ células/pocillo en placas de 6 pocillos y se incubaron en medio DMEM suplementado con FBS y antibióticos. Transcurridas 24 h, las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 30 min en medio de Krebs-Henseleit y durante 2 h más en ausencia o en presencia de glucosa (10 mM). Alternativamente, las células se incubaron en medio DMEM con FBS. A continuación, en todos los casos las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron, se recogieron en PBS y se centrifugaron a 100 g durante 10 min. El sedimento celular se resuspendió en tampón HBS. Las células se incubaron a continuación con 2 μ l de anexina A5-FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.) en 400 μ l de suspensión celular durante 5 min a 20°C y en oscuridad, tras lo que se añadió yoduro de

propidio (2,5 µg/mL, Sigma). Las células así marcadas se analizaron mediante citometría de flujo (Cytomics FC500 Beckman Coulter, Pasadena, CA, EE.UU.). La fluorescencia emitida por la anexina A5-FITC se recoge a una longitud de onda de 525 ± 20 nm (FL1) y la del yoduro de propidio a 620 ± 20 nm (FL3). El número de eventos adquiridos durante cada ensayo fue de 10.000.

3.2.10. ESTADÍSTICA Y OTRAS HERRAMIENTAS INFORMÁTICAS

Para la cuantificación digital de las bandas de los diferentes “Western-blot” se utilizó el programa informático ImageQuant TL v.2005 de Amersham. Los datos de citometría de flujo se analizaron utilizando el programa FlowJo de Tree Star (Ashland, OR, EE.UU.).

Todos los experimentos se repitieron al menos tres veces de manera independiente. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante t de Student con el programa informático SPSS v.14.0 de IBM (Armonk, NY, EE.UU.).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. LA GLUCOSA INDUCE LOS PRINCIPALES MECANISMOS DE DEGRADACIÓN INTRACELULAR DE PROTEÍNAS

La degradación de proteínas dentro de las células ocurre por diferentes mecanismos, siendo los principales la macroautofagia (que, por simplificar, llamaremos a partir de ahora simplemente autofagia) y el sistema ubiquitina-proteasomas. Estos mecanismos proteolíticos, sobre todo el primero, son muy sensibles al entorno en el que se encuentran las células, de forma que pueden ser inducidos o inhibidos por numerosos factores ambientales. El que se induzca o se inhiba la proteólisis viene determinado por una compleja red de vías de señalización que responden a diferentes señales o mensajeros que llegan a la célula. Algunas de las más importantes son las hormonales (por ejemplo la insulina y el glucagón) y las nutricionales (por ejemplo los aminoácidos y la glucosa).

Centrándonos en los nutrientes y en su papel sobre la autofagia, existe un consenso bastante extendido en cuanto a que su disponibilidad inhibe este proceso, mientras que su ausencia lo activa. La autofagia se considera precisamente un mecanismo encargado de proveer a la célula de nutrientes, cuando faltan estos, partir de los propios componentes celulares. Los aminoácidos, cuya adición al medio inhibe la autofagia (Esteban *et al.*, 2007; Ghislat *et al.*, 2012), constituyen un ejemplo claro y muy bien estudiado. En el mismo sentido, se ha descrito con frecuencia que la glucosa reprime la autofagia, aunque, como hemos comentado en la Introducción, también existen algunos datos que contradicen esta afirmación. Sin embargo, muchas de esas investigaciones sobre los efectos de la glucosa en la autofagia se llevaron a cabo utilizando medios de cultivo suplementados con suero y con otros nutrientes que, al regular negativamente la autofagia, pueden enmascarar el efecto de la glucosa (ver por ejemplo (Hariharan *et al.*, 2010; Duan *et al.*, 2011)). Por ello, para poder estudiar el efecto específico de la glucosa sobre la autofagia, hemos considerado conveniente hacerlo en ausencia de cualquiera de esos otros reguladores.

Para el estudio de la regulación de la autofagia en células en cultivo, el medio de Krebs-Henseleit (ver Materiales y Métodos) constituye un medio más adecuado que los medios comerciales de cultivo, sobre todo si a estos se les añade suero. Por eso en el laboratorio empleamos habitualmente el medio de Krebs-Henseleit para estudiar los efectos a corto plazo de señales hormonales y nutricionales sobre la autofagia. Así por ejemplo, ese medio se utilizó

para estudiar algunos aspectos concretos del papel regulador de los aminoácidos y de la insulina sobre la vía proteasomal y la autofágica (Esteban *et al.*, 2007). En ese estudio se concluyó que tanto los aminoácidos como la insulina inhiben la actividad proteolítica de los proteasomas y de la vía autofágica y que los efectos de esos dos factores reguladores era aditivo, afectando cada uno de ellos a procesos tan diferentes como la ubiquitinación, la formación de autofagosomas o el control del pH lisosomal y, por tanto, de la proteólisis en esos orgánulos.

Por ello, al plantearnos ahora analizar el efecto de la glucosa sobre la autofagia, hemos empleado de nuevo el medio de Krebs-Henseleit (que en su formulación original contiene glucosa, ver Materiales y Métodos), pero obviamente comparando el medio sin glucosa con el que la contiene. En ambos casos, el medio lo empleamos tamponado con HEPES, ya que es importante mantener el pH fisiológico para evitar interpretaciones erróneas, como ha ocurrido por ejemplo en otros laboratorios al analizar el efecto de los aminoácidos sobre los niveles intracelulares de calcio (que es también un importante regulador de la autofagia, ver (Ghislat & Knecht, 2012)), como se describe en Ghislat *et al.* (Ghislat *et al.*, 2012). Sin embargo, el efecto tamponador del HEPES a la concentración utilizada aquí es limitado y por eso siempre se controlaba el pH del medio y se ajustaba si era necesario.

4.1.1. LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA

Durante la última década, en la que se ha venido estudiando intensamente la autofagia, han ido apareciendo y perfeccionándose diferentes técnicas para analizar este mecanismo de degradación intracelular de proteínas y cuantificar su actividad, que hasta entonces prácticamente sólo podía hacerse mediante microscopia electrónica o en experimentos de “pulso y caza”. Aunque no existe una única técnica que sea la más adecuada, una de las más ampliamente utilizadas consiste en la detección de los niveles de la proteína LC3-II por “Western-blot”. La proteína LC3-II procede de la proteína LC3-I, que es una proteína citosólica que resulta modificada por la cisteína proteasa Atg4 al cortar su extremo carboxilo para exponer un residuo de glicina. Este residuo se une después covalentemente a la fosfatidiletanolamina para formar la proteína LC3-II que se localiza en la estructura pre-autofagosomal o fagóforo. Una manera alternativa de estimar los niveles de estructuras autofágicas empleando también la proteína LC3 es mediante microscopia de fluorescencia. Para ello, se cuantifican los puntos fluorescentes en células transfectadas con LC3 fusionada a

la GFP o a alguno de sus derivados. Existen otras muchas técnicas que se han utilizado para la estimación de la autofagia (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). Las más aceptadas siguen siendo las que se basan en el análisis de la degradación de proteínas marcadas con isótopos radiactivos en experimentos de “pulso y caza” y en la cuantificación morfométrica de vacuolas autofágicas (autofagosomas y autolisosomas) por microscopia electrónica, empleando criterios morfológicos para identificar cada uno de estos tipos. Asimismo, la determinación de la masa lisosomal, empleando un marcador fluorescente como el LysoTracker, permite estimar de manera comparativa la actividad autofágica entre diferentes condiciones. Esto es posible en el supuesto de que no existan diferencias en la actividad endocítica, que es otra vía por la que puede incorporarse a los lisosomas material, en este caso mayoritariamente extracelular pero también con algún componente de la membrana plasmática.

Puesto que nuestro principal objetivo ha sido conocer el papel de la glucosa como reguladora de la autofagia, comprobamos, en primer lugar, los niveles de LC3-II en células NIH/3T3 incubadas en el medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa. La FIGURA 9A muestra un gel representativo de varios experimentos que siempre dieron resultados similares. En él observamos, al contrario de lo que cabía esperar por lo que se ha comentado más arriba, que en presencia de glucosa (calle 2) los niveles de LC3-II son algo superiores a los detectados en su ausencia (calle 1). Sin embargo, para una interpretación correcta de estos resultados debemos tener en cuenta que durante la evolución del autofagosoma hasta el autolisosoma el primero va adquiriendo hidrolasas lisosomales que degradarán las moléculas de LC3-II que estaban asociadas a la membrana interna del autofagosoma, por lo que las dos bandas en las carreras de la izquierda del gel de la FIGURA 9A representan en realidad los niveles de LC3-II en un equilibrio dinámico, resultado entre su cinética de formación al unirse a la estructura pre-autofagosomal y su cinética de degradación en los autolisosomas. Para cuantificar el primero de estos parámetros hay que inhibir la actividad hidrolítica de los lisosomas. Aquí empleamos cloruro amónico y leupeptina, con los que hemos comprobado que se obtienen niveles de inhibición de la proteólisis lisosomal similares a los que se alcanzan con otros reactivos (como por ejemplo la bafilomicina A₁). El cloruro amónico aumenta el pH lisosomal, lo que reduce la actividad de las hidrolasas lisosomales (cuyo pH óptimo es ácido, sobre todo en el caso de la aspártico proteasa catepsina D), mientras que la leupeptina es un potente inhibidor de las principales proteasas lisosomales (especialmente algunas de las del tipo cisteína-proteasas, como las catepsinas B, H y L). Esto inhibe la degradación del contenido de los autofagosomas cuando pasan a autolisosomas por fusión con lisosomas y endosomas. En esas condiciones, los

niveles de LC3-II en presencia de glucosa aumentan aproximadamente en un 200 % respecto a esos mismos niveles en células privadas de glucosa (ver histograma en la FIGURA 9A).

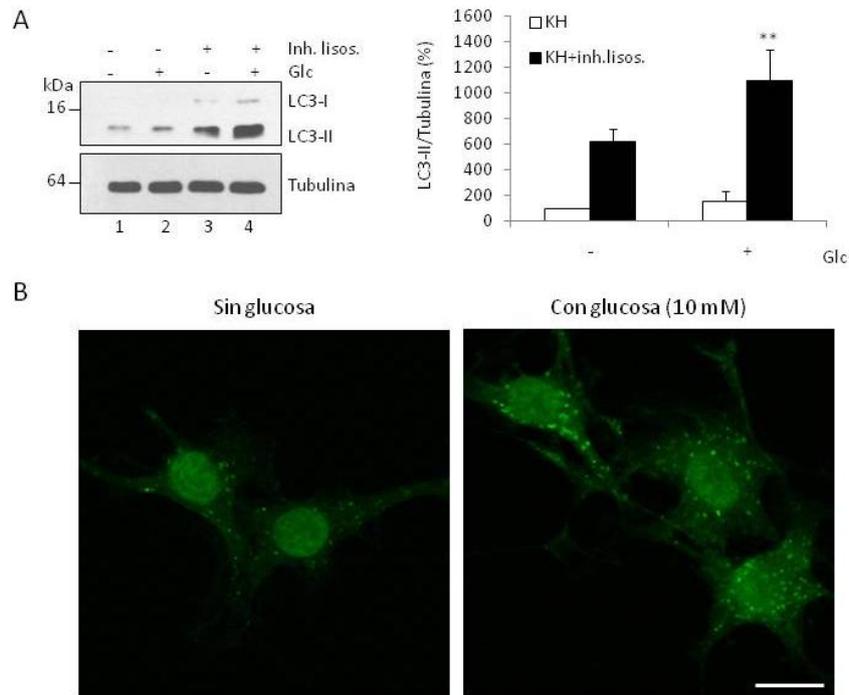


FIGURA 9. La glucosa induce un aumento de la autofagia.

A) Se incubaron fibroblastos de ratón NIH/3T3 en medio de Krebs-Henseleit carente de glucosa durante 30 min. A continuación, se añadieron, según se indica en la figura, glucosa (Glc, 10 mM) y los inhibidores de la actividad lisosomal (Inh. lisos., leupeptina, 100 μ M y cloruro amónico, 20 mM), y las células se incubaron durante 2 h más. Estas se recogieron en el tampón RIPA a 4 $^{\circ}$ C, se vortearon y se centrifugaron para obtener los extractos celulares (ver Materiales y Métodos). Las proteínas se separaron electroforéticamente por SDS-PAGE y se detectaron los niveles de LC3 y de tubulina como control de carga con anticuerpos específicos. En la figura se muestra un “Western-blot” representativo de más de tres experimentos independientes. Se indica a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y tubulina. A la derecha del “Western-blot” se muestra la cuantificación por densitometría de varios de esos experimentos. La diferencia con el valor obtenido en ausencia de glucosa con los inhibidores de lisosomas fue significativa con $P^{**} < 0,01$. **B)** Se incubaron fibroblastos de ratón NIH/3T3 transfectados de forma estable con la proteína de fusión GFP-LC3 durante 30 min en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Posteriormente, se le añadió o no glucosa (10 mM), según se indica, y las células se volvieron a incubarse durante 2 h. Tras este tiempo, las células se fijaron con paraformaldéhidio 2 % durante 20 min y se observaron las preparaciones. Se muestra una imagen de fluorescencia representativa de cada condición. Barra: 10 μ m.

El uso de la proteína de fusión GFP-LC3 permite visualizar los autofagosomas por microscopía de fluorescencia, ya que la proteína GFP-LC3 se une a la membrana de estos haciéndolos visibles en forma de puntos brillantes. Esta es una técnica muy utilizada para comparar el

número de autofagosomas presentes en las células bajo diferentes tratamientos. En la FIGURA 9B se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de las células NIH/3T3 transfectadas de forma estable con GFP-LC3. Las células fueron incubadas durante 2 h en el medio de Krebs-Henseleit con o sin glucosa sin inhibidores lisosomales, de forma que se observa el nivel estacionario de estructuras autofágicas marcadas fluorescentemente con GFP-LC3. Observamos, a simple vista, que en condiciones de presencia de glucosa (10 mM) existe un mayor número de autofagosomas marcados con GFP-LC3 que en las células privadas del azúcar. Este resultado confirma pues los resultados anteriores e indica, de nuevo, que la glucosa induce la formación de autofagosomas.

Como ya se ha comentado, durante la autofagia los autofagosomas (que son un tipo de pre-lisosomas) se fusionan con los endosomas y los lisosomas, adquiriendo así las enzimas hidrolíticas ácidas y, tras eliminar una de las membranas del autofagosoma, acidifican su contenido al incorporar a su membrana una bomba de protones como consecuencia de esas fusiones. De esta manera, pasan a convertirse en autolisosomas (que son un tipo de lisosomas) que degradan el contenido celular atrapado por los autofagosomas. Esa acidez intraluminal es bastante específica de los lisosomas, lo que permite el uso de sondas fluorescentes que se acumulan en dichas estructuras, como por ejemplo el LysoTracker Red. En un medio neutro, como el citosol, la sonda LysoTracker Red está en un estado no-cargado, lo que le permite atravesar la membrana de los lisosomas y otras estructuras ácidas. Una vez en el interior de los lisosomas, la sonda queda retenida. De esta manera, la cuantificación de la fluorescencia emitida por esa sonda nos permitió conocer los niveles de lisosomas existentes en las células en las condiciones de incubación ensayadas (con o sin glucosa) y determinar si las diferencias observadas en la formación de autofagosomas iban acompañadas, como era de esperar, por una variación similar en la cantidad de lisosomas existentes. Las imágenes que se muestran en la FIGURA 10A indican que la glucosa incrementa el número de estructuras lisosomales positivas para el LysoTracker Red respecto a las células en ayuno de glucosa. Esos datos (ver histograma en la FIGURA 10B), mostraron que la incubación de las células NIH/3T3 con 10 mM de glucosa indujo un incremento en los niveles de lisosomas de aproximadamente dos veces respecto a los valores en las células incubadas sin glucosa. Estos valores son coincidentes con los obtenidos al analizar los niveles de LC3-II y los complementan e indican, por tanto, que el efecto de la glucosa sobre la autofagia consiste esencialmente en aumentar la formación de autofagosomas (ver FIGURA 9A y B), cuya maduración hasta autolisosomas transcurre aparentemente de manera adecuada (ver FIGURA 10B).

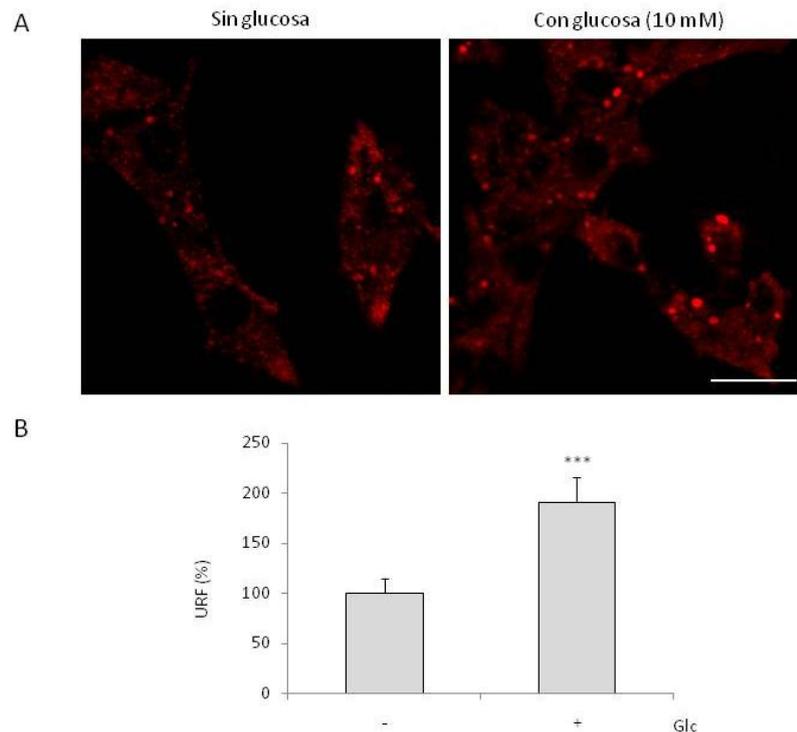


FIGURA 10. La glucosa induce un aumento de la masa lisosomal.

Se incubaron fibroblastos de ratón NIH/3T3 en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Transcurridos 30 min, se añadió o no glucosa (Glc, 10 mM) y las células se incubaron durante 2 h más. Durante los últimos 20 min se añadió el fluoróforo LysoTracker Red a una concentración de 50 nM. **A)** Las células se lavaron y se fijaron con paraformaldehído (2 %) y las preparaciones se tiñeron con DAPI disuelto en el medio de montaje y se observaron en un microscopio de fluorescencia. Barra: 20 μ m. **B)** Después de medir en un lector de fluorescencia la señal del LysoTracker Red emitida a 590 nm, las células se volvieron a lavar, se incubaron con DAPI (300 nM diluido en PBS) durante 5 min y se midió ahora la fluorescencia emitida a 460 nm. Se muestran los resultados de diferentes experimentos en los que se realizaron mediciones, en un lector de placas, de todas las fluorescencias emitidas y que representan los valores medios y la desviación estándar obtenidas a partir de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. Se muestra la relación de fluorescencias entre el LysoTracker Red y el DAPI expresada en unidades relativas de fluorescencia (URF) referidas (en porcentaje) a los valores obtenidos en ausencia de glucosa. La diferencia con el valor obtenido en ausencia de glucosa fue significativa con $P^{***} < 0,005$.

Las vacuolas autofágicas comprenden autofagosomas y autolisosomas y es posible identificar, mediante microscopia electrónica y empleando criterios morfológicos, estructuras que corresponden a los dos tipos de vacuolas autofágicas. Esas estructuras son las vacuolas autofágicas inmaduras (Avi), equivalentes aproximadamente a los autofagosomas, y las vacuolas autofágicas maduras (Avd), equivalentes aproximadamente a los autolisosomas. En la FIGURA 11A se muestran dos micrografías representativas del citoplasma de las células NIH/3T3 incubadas con (imagen derecha) o sin (imagen izquierda) glucosa (10 mM).

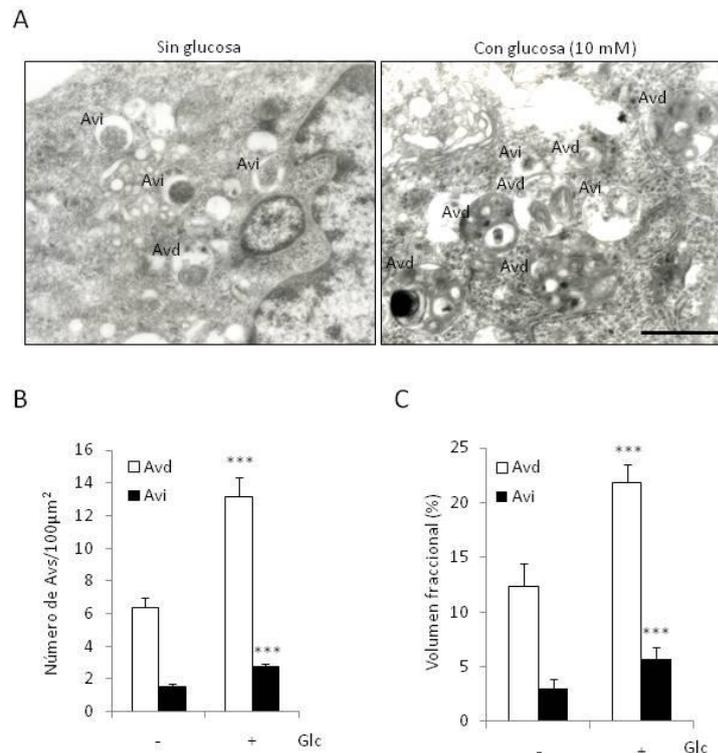


FIGURA 11. El número y el volumen fraccional de las vacuolas autofágicas se duplica en presencia de glucosa.

Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en un medio de Krebs-Henseleit carente de glucosa. Después, se añadió, o no, glucosa (10 mM) y las células se incubaron durante 2 h más. Finalmente, las células se recogieron, se fijaron y se procesaron para microscopía electrónica como se describe en Materiales y Métodos. En (A) se muestran dos micrografías electrónicas representativas de las células incubadas con y sin glucosa. En ellas se indican las estructuras autofágicas inmaduras (Avi) y las maduras (Avd). Aplicando criterios morfológicos (ver texto en Resultados) para la identificación de los dos tipos de vacuolas autofágicas, se muestra también la cuantificación del número (referido a 100 μm² de citoplasma) (B) y del volumen fraccional en % (C) de las Avi (barras negras) y las Avd (barras blancas) en las células tratadas con y sin glucosa (Glc). Los resultados son la media y la desviación estándar de cuatro y cinco experimentos independientes, respectivamente, con un recuento total de 200 secciones de células por tratamiento en el caso del número de Av y un total de 600 medidas en el caso del volumen fraccional. Barra: 1 μm. Las diferencias con los valores obtenidos en ausencia de glucosa fueron significativos con P*** <0,005.

En el microscopio electrónico la vacuola tipo Avi aparece limitada por una doble membrana o, en ocasiones, por una membrana sencilla, y encierra porciones de citoplasma que incluyen casi siempre orgánulos, como mitocondrias, retículo endoplásmico, complejo de Golgi, etc., bastante intactos para ser identificados. En cambio, la vacuola Avd está siempre delimitada por una sola membrana y contiene restos de orgánulos en diferentes estados de degradación y numerosas membranas, reflejando el proceso degradativo que ocurre en los autolisosomas.

Mediante métodos morfométricos (ver Materiales y Métodos), aplicados a un número representativo de micrografías electrónicas similares a las mostradas, calculamos el número de

vacuolas del tipo Avi y Avd y su volumen fraccional en las células NIH/3T3 incubadas en presencia o ausencia de glucosa. Una vez más, cuando la glucosa se hallaba presente se observó un incremento de más de dos veces tanto en el número (FIGURA 11B) como en el volumen fraccional (FIGURA 11C) de las Avi y las Avd respecto a las células incubadas en condiciones de privación de glucosa. Esto apoya la conclusión anterior de que la glucosa aumenta el número de autofagosomas que maduran hasta autolisosomas sin que, aparentemente, ocurran cambios importantes en sus tamaños (pero sí en su número).

Hasta el momento, hemos mostrado que la glucosa produce un incremento en los niveles de estructuras autofágicas, ya sean autofagosomas o autolisosomas. Esto sugiere que la actividad proteolítica de la vía autofágica también aumenta en esas condiciones. Para confirmar esto de manera directa, realizamos experimentos de “pulso y caza” (FIGURA 12), marcando en primer lugar las proteínas de las células durante un cierto tiempo (“pulso”) con un aminoácido radioactivo (en este caso la L-[³H]-valina). Después, tras eliminar el aminoácido radioactivo y sustituir el medio de incubación por otro conteniendo un exceso del aminoácido frío (L-valina 10 mM), se analizó durante otro intervalo de tiempo (“caza”) la degradación de las proteínas marcadas radioactivamente durante el “pulso”. Los tiempos de “pulso y caza” utilizados aquí fueron elegidos para estudiar la degradación de las proteínas de vida media larga, ya que son las proteínas más abundantes (el 98 % o más). La FIGURA 12 (barras blancas) muestra que la presencia de glucosa incrementa la degradación de proteínas de vida media larga en aproximadamente dos veces ($2,94 \pm 0,46$ %/h) respecto a la proteólisis observada en las células incubadas sin glucosa ($1,71 \pm 0,32$ %/h). Sin embargo, hemos de tener en cuenta que la degradación analizada aquí es la total, es decir la que llevan a cabo todos los mecanismos de degradación intracelular de proteínas de los que dispone la célula. Por ello, y para conocer el efecto de la glucosa sobre la degradación de proteínas de vida media larga que se degradan por la vía autofágica exclusivamente, utilizamos la 3-metiladenina, que inhibe la autofagia a través de la inhibición de la actividad de la PI3K de clase III, una quinasa que actúa como un importante regulador positivo de la autofagia (Wu *et al.*, 2010). Así, la diferencia entre los porcentajes de la proteína total degradada y de la proteína que se degrada en presencia de 3-metiladenina (que corresponde a la proteína que resulta degradada por vías diferentes a la autofagia) proporciona una estimación de la actividad autofágica. La FIGURA 12 muestra, en primer lugar, que en presencia de glucosa (las dos barras de la derecha en el histograma) la proteína degradada por autofagia (barra negra) corresponde aproximadamente a un 40 % de la degradación total que ha ocurrido ($0,85 \pm 0,09$ %/h) y, en segundo lugar, que en esas mismas condiciones la actividad autofágica en las células (barras negras) supera en casi dos

veces a la observada en ausencia de glucosa ($0,47 \pm 0,07$ %/h). Por tanto, y en resumen, todos los datos descritos en este apartado indican que en las células NIH/3T3 incubadas en un medio simple, como es el medio de Krebs-Henseleit, la glucosa activa la autofagia incrementando la formación de los autofagosomas, que después pasan a autolisosomas donde se degrada su contenido.

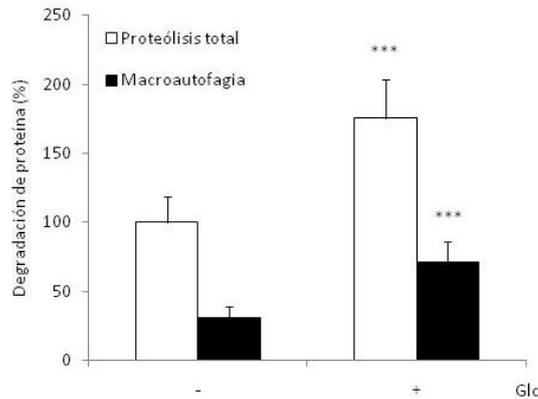


FIGURA 12. La proteólisis intracelular es inducida por la glucosa y esto ocurre en parte a través de la autofagia.

Las células NIH/3T3 incubadas en el medio DMEM suplementado con suero bovino fetal se incubaron con L-[3 H]-valina durante 24 h como se describe en Materiales y Métodos. Después, las células se lavaron con PBS, el medio se sustituyó por uno nuevo reemplazando el aminoácido radioactivo por L-valina no radioactiva (10 mM) para reducir la reutilización de aquel y las células se volvieron a incubar durante 24 h. Posteriormente, y tras una incubación previa durante 30 min en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa y en presencia o no de un inhibidor de la autofagia (3-metiladenina, 10 mM), se añadió donde se indica la glucosa a una concentración de 10 mM y se realizó una nueva incubación de 2 h. Transcurrido este tiempo se tomaron muestras del medio extracelular a diferentes tiempos (1 h, 2,5 h y 4 h), se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético, se midió la radioactividad presente en el sobrenadante con un contador de centelleo líquido y, tras medir la radioactividad precipitable en ácido tricloroacético que quedaba en las células de la misma manera, se determinó la degradación de proteínas como se describe en Materiales y Métodos. En la figura se representan la media y la desviación estándar del porcentaje de proteína degradada por hora, tanto la correspondiente a la proteólisis total (barras blancas) como la degradada por autofagia solo (barras negras), y se expresan referidas (en porcentaje) al valor de la proteólisis total en ausencia de glucosa (que fue de $1,71 \pm 0,32$ %/h). Las diferencias con los valores respectivos (para la proteólisis total y para la proteólisis por autofagia) obtenidos en ausencia de glucosa fueron significativos con $P^{***} < 0,005$.

4.1.2. LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBIQUITINA-PROTEASOMAS

Al final del apartado anterior hemos visto que, en la línea celular analizada y en presencia de glucosa, la proteólisis por autofagia corresponde a un 40 % de la proteína degradada total. Esto nos indica que, en esas condiciones, la proteólisis total no se debe exclusivamente a la autofagia.

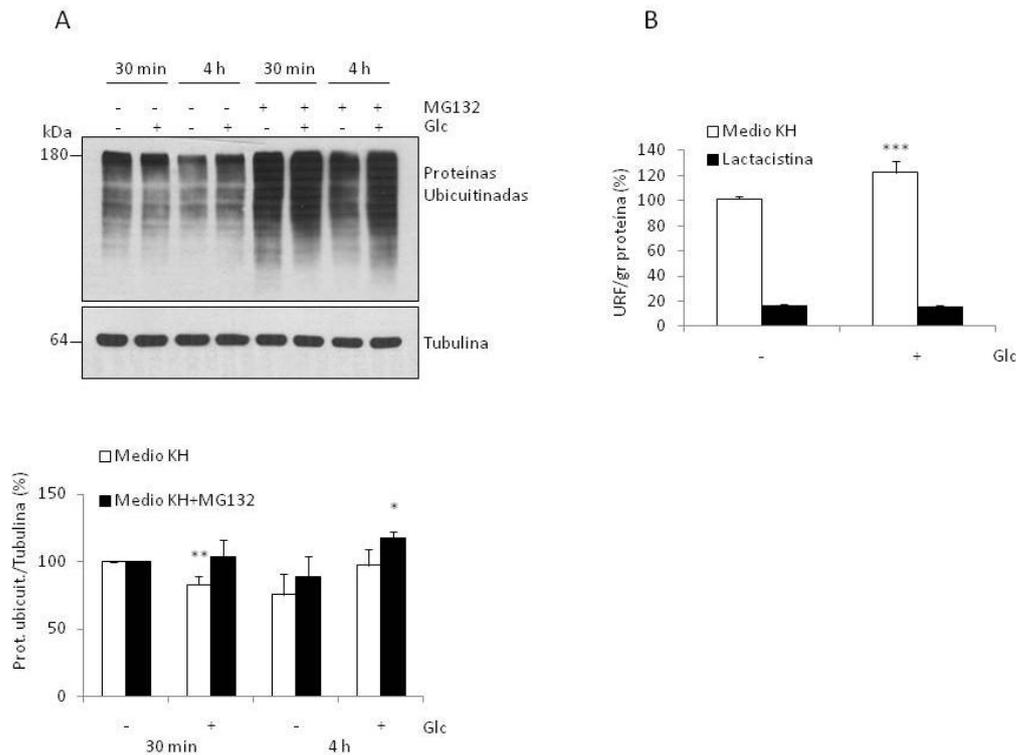


FIGURA 13. La glucosa induce la ubiquitinación de proteínas y aumenta la actividad similar a quimotripsina de los proteasomas.

A) Para analizar la ubiquitinación, las células NIH/3T3 se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min y, a continuación, se añadió o no glucosa (Glc, 10 mM) durante 30 min o durante 4 h, en presencia o en ausencia de un inhibidor de los proteasomas (MG132 50 μ M), según se indica en la figura. Las células se recogieron en tampón RIPA, las proteínas de las muestras resultantes se separaron por SDS-PAGE y los niveles de las proteínas mono y poliubiquitinadas se detectaron con un anticuerpo específico para ellas (FK2). Los mismos cambios se observaron empleando otro anticuerpo que reconoce sólo proteínas poliubiquitinadas (FK1, datos no mostrados). Como control de carga se emplearon también anticuerpos que reconocen a la tubulina. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa. En el histograma de abajo se representan las medias y las desviaciones estándar de la relación de proteína ubiquitinada (Prot. ubiquit./Tubulina, referidas (en porcentaje) a esos valores en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa y con o sin el inhibidor MG132, procedentes de tres experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido para cada medio en ausencia de glucosa fue significativa con $P^* < 0,05$ y $P^{**} < 0,01$. **B)** Para determinar la actividad similar a la quimotripsina, las células se incubaron durante 30 min en un medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, se añadió, o no, la glucosa (10 mM) según se indica y se mantuvieron las células en una incubación adicional de 4 h. Después, se obtuvieron los extractos celulares como se describe en Materiales y Métodos, estos se incubaron con el sustrato fluorogénico N-Suc-LLVY-MCA (50 μ M) y se siguió la cinética de producción de fluorescencia (a 460 nm) a 37 °C y durante 1 h. Como control negativo de la actividad análoga a la quimotripsina del proteasoma se añadió el inhibidor específico de los proteasomas lactacistina (10 μ M) (barra negra). Los valores, se expresan en unidades relativas de fluorescencia (URF) por g de proteína, referidas (en porcentaje) a los valores obtenidos en ausencia de glucosa y lactacistina, y representan la media y la desviación estándar de tres experimentos independientes con tres réplicas cada uno. La diferencia con el valor obtenido en ausencia de glucosa fue significativa con $P^{***} < 0,005$.

Junto a la autofagia, la vía ubiquitina-proteasomas es el mecanismo proteolítico más importante. Una diferencia destacada entre ambos mecanismos se refiere a los sustratos

degradados y a la especificidad en el reconocimiento de los mismos. Mientras que durante la autofagia se degradan porciones de citoplasma que incluyen toda clase de moléculas y se trata, en su mayor parte, de un proceso poco específico, los proteasomas degradan solamente proteínas, tanto en el núcleo como en el citoplasma, y además lo hacen de una forma específica que viene determinada por la poliubiquitinación de los sustratos y que afecta, sobre todo pero no únicamente, a las proteínas celulares con una vida media muy corta.

El mecanismo de degradación de proteínas por la vía ubiquitina-proteasomas tiene dos fases principales bien diferenciadas: i) la poliubiquitinación de las proteínas que van a degradarse, mediante la acción concertada de tres tipos de enzimas E1, E2 y E3, y ii) la rotura de enlaces peptídicos en esas proteínas, tras su desubiquitinación, en los proteasomas mediante tres actividades proteolíticas. De estas actividades, la similar a la quimotripsina es la más importante para la degradación intracelular de proteínas.

Por ello, analizamos separadamente, empleando técnicas estándar utilizadas en otros trabajos (Aguado *et al.*, 2010; Esteve *et al.*, 2010; Vidal-Donet *et al.*, 2013), el efecto de la glucosa sobre esas dos fases: la poliubiquitinación, mediante “Western-blot”, utilizando anticuerpos específicos que detectan proteínas poliubiquitinadas (y también las monoubiquitinadas) y la proteólisis por la actividad similar a la quimotripsina del proteasoma, determinando esa actividad con un sustrato fluorescente específico, el N-Suc-LLVY-MCA.

Como muestra el “Western-blot” de la FIGURA 13A, en presencia de glucosa los niveles de las proteínas poliubiquitinadas son algo superiores a los observados en su ausencia, al menos tras periodos prolongados (4 h) de incubación (ver las cuatro primeras calles del “Western-blot”). Estos niveles de proteínas poliubiquitinadas corresponden al estado estacionario de la poliubiquitinación y desubiquitinación de las proteínas seguida de su degradación por los proteasomas.

Para la detección de la actividad de poliubiquitinación, inhibimos los proteasomas con un inhibidor de la actividad proteolítica proteasomal, el MG132, y que, al evitar que las proteínas poliubiquitinadas sean degradadas, permite que se acumulen. Por eso, en presencia de MG132 los niveles de las proteínas poliubiquitinadas son, en todos los casos (comparar en el gel de la FIGURA 13A las cuatro últimas calles con las cuatro primeras), claramente superiores a los observados en ausencia del inhibidor proteasomal. En esas condiciones observamos un incremento de la poliubiquitinación inducido por la glucosa, más marcado tras 4 h de

incubación. Estos resultados indican que la glucosa activa la poliubiquitinación de las proteínas (ver el histograma de la FIGURA 13A).

Los proteasomas tienen tres actividades proteolíticas (similar a la quimotripsina, similar a la tripsina y similar a caspasas) que difieren en el reconocimiento del sitio de corte en la secuencia de aminoácidos de las proteínas sustrato (Pan *et al.*, 2010). La actividad similar a quimotripsina puede cuantificarse con el uso del fluoróforo N-Suc-LLVY-MCA, que emite fluorescencia cuando se libera el MCA al entrar el sustrato en el proteasoma y tras el reconocimiento de la secuencia LLVY. Por tanto, una mayor emisión de fluorescencia indicará una mayor actividad proteolítica similar a la quimotripsina de los proteasomas. En estos estudios (FIGURA 13B) utilizamos como control un inhibidor muy específico de los proteasomas, la lactacistina, que reduce en aproximadamente un 90 % la actividad determinada en nuestras condiciones, lo que indica que casi toda la fluorescencia producida en estos experimentos se debe a la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas. Teniendo en cuenta esto, y tras descontar la actividad que queda después del tratamiento con lactacistina, concluimos que la actividad similar a la quimotripsina en un medio con glucosa es aproximadamente un 20 % mayor que en un medio carente de glucosa.

Por tanto y en resumen, tanto la ubiquitinación de proteínas como la actividad análoga a la quimotripsina de los proteasomas aumentan en presencia de glucosa, como ocurría en el caso de la autofagia.

4.2. LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA ES UN EFECTO GENERAL PARA DIFERENTES TIPOS CELULARES Y SU INTENSIDAD PUEDE MODULARSE POR OTROS FACTORES

Los resultados mostrados anteriormente son opuestos a las conclusiones más difundidas sobre que la glucosa es un inhibidor de la autofagia en células de mamífero (ver Introducción). Sin embargo, en muchos casos estas conclusiones están basadas en resultados donde varios tipos celulares eran incubados, con concentraciones altas o bajas de glucosa, en medios completos (DMEM, MEM o RPMI) y suplementados, o no, con suero (por ejemplo Hariharan *et al.* (2010); Duan *et al.* (2011)). Por ello, comprobamos si el efecto de la glucosa sobre la autofagia descrito arriba ocurría también en otros tipos celulares y si podía modificarse cuando existen en el medio otros factores moduladores de esa vía proteolítica.

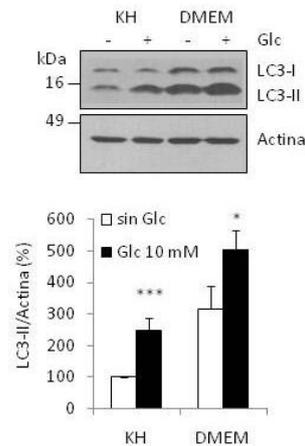


FIGURA 14. La autofagia inducida por glucosa ocurre no solo en el medio de Krebs-Henseleit sino también en el DMEM.

Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en un medio de Krebs-Henseleit (KH) o en DMEM sin glucosa. A continuación se añadieron a los medios los inhibidores de la proteólisis lisosomal, NH_4Cl y leupeptina, y, donde se indica, glucosa (Glc, 10 mM) y se prolongó la incubación durante 2 h más. Las células se recogieron en el tampón RIPA, se lisaron y las muestras se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida. Los niveles de los autofagosomas se estimaron por “Western-blot” con un anticuerpo que reconoce la proteína LC3 y, como control de carga, se utilizó la actina. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. En el histograma de abajo se representan las medias y las desviaciones estándar de la relación de LC3-II/Actina, referidas (en porcentaje) a esos valores en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, procedentes de cinco experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido para cada medio en ausencia de glucosa fue significativa con $P^* < 0,05$ y $P^{***} < 0,005$.

En la FIGURA 14 se representan los niveles de LC3-II en el medio de Krebs-Henseleit y en DMEM con y sin glucosa. Puede verse que la diferencia que vemos en los niveles de LC3-II en el medio de Krebs-Henseleit con y sin glucosa también ocurre en el medio DMEM (que por sí sólo, y al menos en estas células, también aumenta la autofagia). Además, la estimulación de la autofagia por la glucosa no es específica para las células NIH/3T3 (fibroblastos embrionarios de ratón), sino que también ocurre en otras líneas celulares establecidas, como en las células HEK293T (FIGURA 15A) y en las células HeLa (FIGURA 15B), así como en cultivos de células MEF (FIGURA 15C). En todos estos casos, las diferencias en los niveles de LC3-II que se observaban con y sin glucosa en el medio de Krebs-Henseleit se mantienen en el medio DMEM, en el que la glucosa a veces produce incluso un mayor efecto (ver FIGURA 15A y B).

Hemos observado también que la presencia de suero bovino fetal reduce claramente el efecto de la glucosa sobre los niveles de LC3-II (FIGURA 16), aunque la diferencia (que en el caso del medio DMEM sin suero bovino fetal no es significativa) sigue apreciándose. Por tanto, aunque el efecto de la glucosa sobre la autofagia descrito en el apartado anterior se mantiene y afecta

a todas las células estudiadas aquí, la presencia en el medio de otros factores moduladores de la vía proteolítica (como el suero bovino fetal) puede enmascararlo, al menos parcialmente.

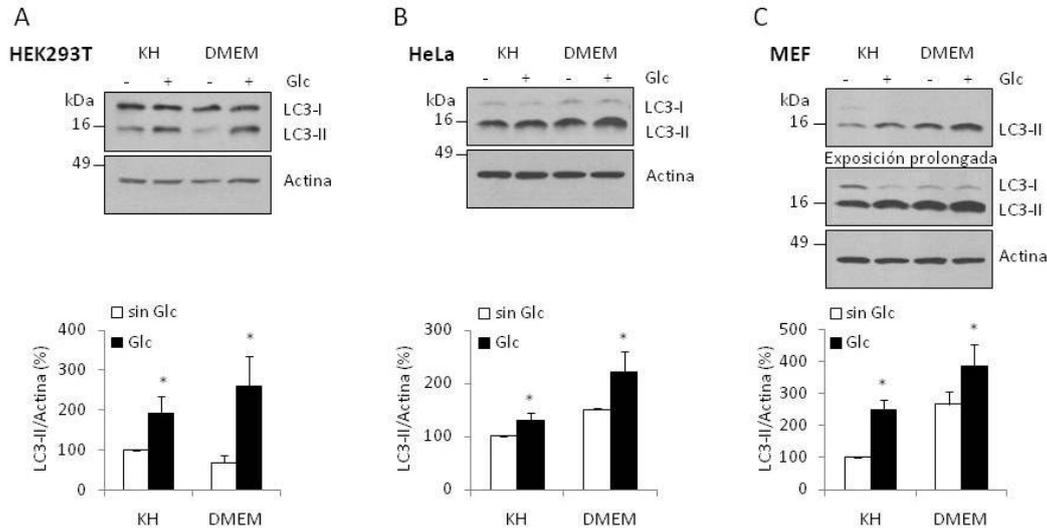


FIGURA 15. La inducción de la autofagia por glucosa ocurre en diferentes tipos celulares.

Las células HEK293T (A), HeLa (B) y MEF (C) se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit (KH) o en DMEM, en ambos casos en ausencia de glucosa. Después se añadieron los inhibidores de la proteólisis lisosomal, NH_4Cl 20 mM y leupeptina 100 μM , y, donde se indica, la glucosa (Glc, 10 mM), prolongándose la incubación 2 h más. Las células se recogieron en el tampón RIPA, se lisaron y las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida. Los niveles de LC3 y, como control de carga, de actina se detectaron con anticuerpos específicos. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. En los MEFs se muestra una exposición más prolongada del mismo gel (abajo) para visualizar las bandas de LC3-I. En los histogramas de debajo de cada "Western-blot" se representan las medias y las desviaciones estándar de la relación de LC3-II/Actina, referidas (en porcentaje) a esos valores en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, procedentes de, al menos, tres experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido para cada medio en ausencia de glucosa fue significativa con $P^* < 0,05$.

A partir de datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio, sabemos que en el medio de Krebs-Henseleit con glucosa los aminoácidos inhiben la autofagia (Ghislat *et al.*, 2012; Esteban *et al.*, 2007). Puesto que la glucosa la induce, comprobamos cuál era el efecto de la glucosa sobre la autofagia en presencia de aminoácidos. La FIGURA 17A muestra el porcentaje de proteína degradada en células privadas o suplementadas con glucosa y/o aminoácidos esenciales. De forma similar a los resultados obtenidos en la FIGURA 12, la adición de glucosa al medio de Krebs-Henseleit incrementa un 50 % la degradación de proteínas respecto a la falta de glucosa. En cambio, este valor se ve reducido cuando en el medio de Krebs-Henseleit también están presentes los aminoácidos. Fijándonos ahora en los aminoácidos, cuando se añaden a un medio con glucosa, la degradación de proteínas se inhibe un 30 %

aproximadamente. Este valor es similar a los resultados obtenidos por Esteban *et al.* (2007) con fibroblastos humanos (34 %). En cambio, cuando se añaden los aminoácidos al medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, la inhibición de la proteólisis es mucho más reducida (aproximadamente un 10 %).

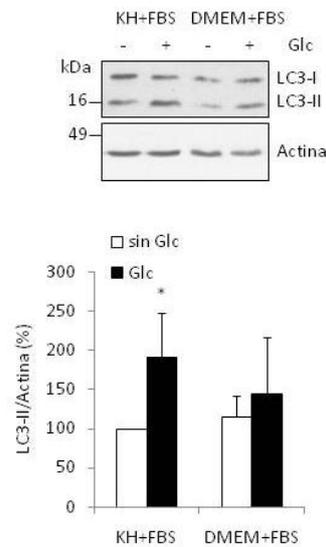


FIGURA 16. La autofagia inducida por glucosa también ocurre en presencia de otros factores que la modifican.

Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en un medio de Krebs-Henseleit (KH) o en medio DMEM sin glucosa y con suero bovino fetal (FBS). Transcurrido este tiempo, se añadieron los inhibidores NH_4Cl y leupeptina. Donde se indica, también se añadió glucosa (Glc, 10 mM) y se prolongó la incubación durante 2 h más. Las células se recogieron en el tampón RIPA, se lisaron y las muestras se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida. Se analizaron por “Western-blot” los niveles de la proteína LC3 y de la actina como control de carga, empleando anticuerpos específicos que reconocen esas proteínas. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. En el histograma, abajo, se representan las medias y las desviaciones estándar de la relación de LC3-II/Actina, referidas (en porcentaje) a esos valores en medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, procedentes de tres experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido para cada medio en ausencia de glucosa fue significativa con $P^* < 0,05$.

Para corroborar estos resultados, analizamos los niveles de LC3-II en células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit con y sin glucosa y/o aminoácidos (FIGURA 17B). Aquí se observa también que la glucosa aumenta los niveles de LC3-II y, por tanto, la autofagia y que esto parece que ocurre incluso en presencia de aminoácidos aunque con menor intensidad. En cuanto al efecto de los aminoácidos, se observa que también reducen los niveles de LC3-II, especialmente en el medio de Krebs-Henseleit con glucosa.

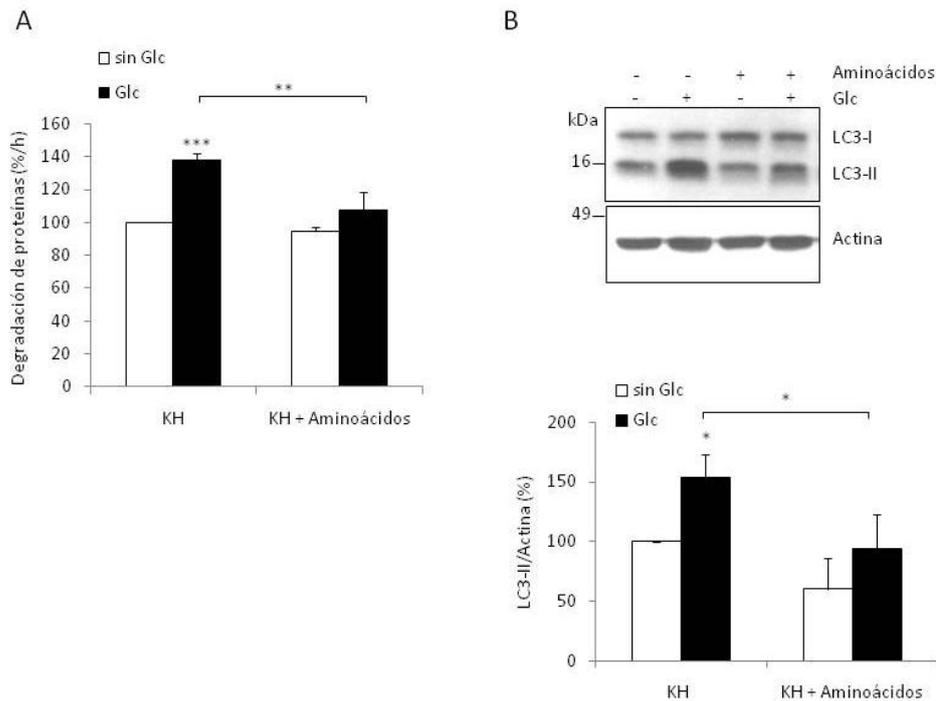


FIGURA 17. Los aminoácidos inhiben la proteólisis inducida por glucosa.

A) Las células NIH/3T3 se incubaron en el medio DMEM suplementado con suero bovino fetal y las proteínas se marcaron radioactivamente con L-[³H]-valina durante 24 h. Las células se lavaron, el medio se sustituyó por DMEM fresco y el aminoácido radioactivo por L-valina no radioactiva (10 mM), y las células se volvieron a incubar durante 24 h. Después, las células se lavaron, se incubaron en medio de Krebs-Henseleit (KH) sin glucosa durante 30 min y, seguidamente, se añadieron, donde se indica, glucosa (Glc, 10 mM) y/o aminoácidos a una concentración que correspondía al doble de la que existe en el medio DMEM. Se tomaron muestras del medio extracelular a diferentes tiempos, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético, se midió la radioactividad en el sobrenadante y, tras medir la radioactividad precipitable en ácido tricloroacético que quedaba en las células se determinó la degradación intracelular de proteínas como se indica en Materiales y Métodos. En la figura se representan la media y la desviación estándar del porcentaje de proteína degradada por hora, tanto sin (barras blancas) como con (barras negras) glucosa, calculadas a partir de cuatro experimentos diferentes, y se expresan referidas (en porcentaje) al valor de la proteólisis total en el medio de Krebs-Henseleit en ausencia de glucosa (1,51 ± 0,06 %/h). Las diferencias con los valores obtenidos en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^{**} < 0,01$ y $P^{***} < 0,005$. **B)** Las células NIH/3T3 se incubaron en un medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min y después, durante 2 h, en el mismo medio pero con o sin glucosa (Glc, 10 mM) y/o aminoácidos a la concentración indicada en **(A)**. La actividad proteolítica de los lisosomas se inhibió con leupeptina (100 μM) y cloruro amónico (20 mM). Las células se recogieron en el tampón RIPA y las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente para transferirlas a una membrana de PVDF en la que se detectaron los niveles de LC3-II y, como control de carga, de actina con anticuerpos específicos. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. Se muestra una imagen representativa y, abajo, el histograma con las medias y las desviaciones estándar de la cuantificación de los niveles de LC3-II/Actina referidas (en porcentaje) a los valores en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa ni aminoácidos, de tres experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido para cada medio en ausencia de glucosa ni aminoácidos fue significativa con $P^* < 0,05$.

En resumen, la glucosa incrementa la autofagia a nivel de la formación de los autofagosomas, lo que conlleva un aumento en la degradación de las proteínas, mientras que, por el contrario, los aminoácidos reprimen la autofagia. Estos resultados indican que: i) a pesar de tratarse de nutrientes, los aminoácidos y la glucosa tienen efectos opuestos sobre la autofagia; ii) el efecto inhibitorio de los aminoácidos en la autofagia se hace más notable cuando la degradación de proteínas está estimulada por la glucosa; y iii) la ausencia de glucosa tiene un efecto inhibitorio sobre la autofagia que es similar (e incluso mayor) al que produce la adición de los aminoácidos. El hecho de que la inhibición de la autofagia por los aminoácidos sea mayor en presencia de glucosa podría explicarse de dos formas. La primera, porque posiblemente la glucosa regula, de forma independiente, una fase anterior de la autofagia a la que regula la vía de señalización de los aminoácidos. Y la segunda, porque la señal activadora de la glucosa es más potente que la señal inhibitoria de los aminoácidos.

En definitiva, los resultados mostrados en este apartado indican que el efecto activador de la glucosa sobre la autofagia ocurre en todos los tipos celulares que hemos ensayado (NIH/3T3, HEK293T, HeLa y fibroblastos embrionarios de ratón) y que la presencia de otros factores puede modular la intensidad de ese efecto, pudiendo llegar a enmascararlo aunque casi siempre sólo de manera parcial.

4.3. ANÁLISIS DE LOS MECANISMOS DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADOS POR GLUCOSA

Todos los datos obtenidos hasta el momento nos confirman que la glucosa actúa como un factor inductor de la autofagia. Como comentamos en la Introducción, estos resultados son contrarios a las observaciones realizadas en muchos trabajos de que la privación de glucosa induce la autofagia. Sin embargo, existen en la bibliografía algunos datos, aunque más escasos, que apoyarían nuestras conclusiones. Así por ejemplo, un aumento de los niveles de ROS estimulado por una concentración elevada de glucosa (25 mM) (Al-Kafaji & Golbahar, 2013) puede inducir la autofagia. Además, y por otro lado, se sabe desde hace tiempo que la autofagia consume ATP (Plomp *et al.*, 1987), por lo que parece lógico que la glucosa, al proporcionar ATP a la célula, facilite la autofagia, aunque no hay que olvidar que la autofagia también contribuye a producir metabolitos que pueden ser utilizados como fuente de energía. Por estas razones nos propusimos, en primer lugar, comprobar si la glucosa, a la concentración empleada en nuestros experimentos (10 mM), induce un aumento de los niveles de ROS y, en

segundo lugar, determinar si la activación de la autofagia en presencia de glucosa depende de la producción de ATP.

4.3.1. LA GLUCOSA REDUCE LOS NIVELES DE ROS EN EL MEDIO DE KREBS-HENSELEIT

La inducción de la autofagia es considerada generalmente como una respuesta a una crisis energética de la célula producida por la falta de nutrientes. Sin embargo, la autofagia puede activarse también como un mecanismo citoprotector, por ejemplo frente a un estrés oxidativo originado por diferentes tipos de estímulos. En el caso de la glucosa, tanto la privación como el exceso de esta pueden llevar a un desajuste entre la cadena respiratoria mitocondrial y la actividad de las H⁺-ATPasas, lo que genera un aumento de la concentración de ROS (Giacco & Brownlee, 2010; Lee *et al.*, 2012a).

La concentración de la glucosa utilizada en nuestra investigación (10 mM) se encuentra dentro del rango de la concentración normal de glucosa en sangre de ratones (6-18 mM) (Andrikopoulos *et al.*, 2008). A pesar de esto, comprobamos si las condiciones de incubación a las que se sometía a las células en los experimentos que habíamos realizado inducían un estrés oxidativo, ya que un aumento en los niveles de ROS en esas condiciones podría explicar, al menos en parte, la inducción de la autofagia en presencia de glucosa observada anteriormente.

Para estimar los niveles de ROS en las células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit, completo o sin glucosa, cuantificamos la fluorescencia emitida por la oxidación de dos fluoróforos, la dihidrorodamina y la hidroetidina (FIGURA 18). La dihidrorodamina se oxida en presencia de peróxido de hidrógeno, mientras que la hidroetidina lo hace por el ión superóxido y, en esas condiciones, pueden ser excitadas y emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda (ver Materiales y Métodos).

En la FIGURA 18 se representan “dot-plots” característicos junto con los histogramas para cada fluoróforo de las células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit con o sin glucosa. Tomando como referencia los valores del tratamiento sin glucosa, observamos que al adicionarla a la concentración utilizada en nuestros ensayos (10 mM) se reduce la oxidación de hidroetidina y dihidrorodamina en aproximadamente un 40 y un 15 %, respectivamente. Estos datos indican claramente que la adición de glucosa a un medio mínimo como es el medio de Krebs-Henseleit

supone una disminución de la situación de estrés en que se encuentran las células. De hecho, no se observaron grandes diferencias (en torno a un 10 %) en los niveles de ROS en el medio de Krebs-Henseleit con glucosa respecto a un medio completo (DMEM suplementado con suero bovino fetal, datos no mostrados).

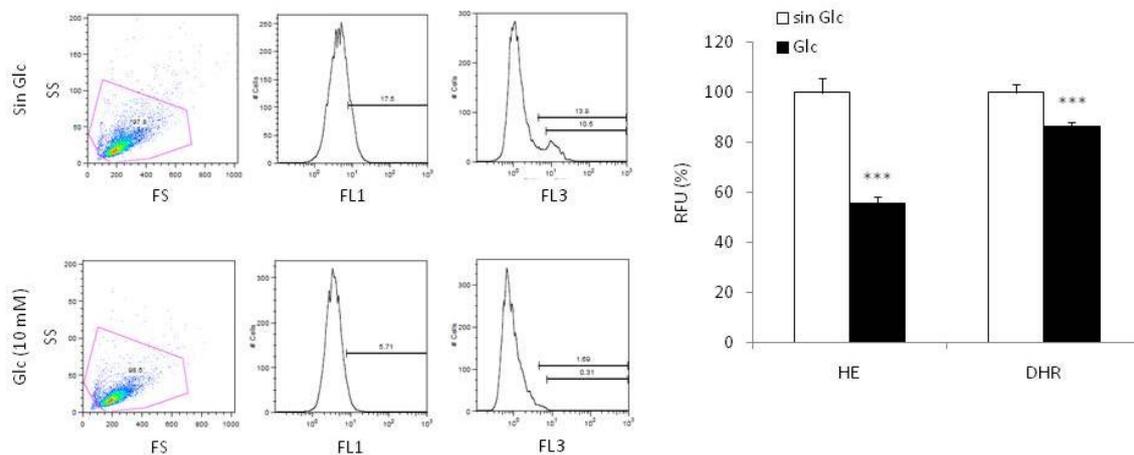


FIGURA 18. La glucosa reduce los niveles de ROS producidos por ausencia de la misma.

Las células NIH/3T3 se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit con (a una concentración de 10 mM) o sin glucosa (Glc) durante 2 h. Después, las células se separaron con tripsina y se mantuvieron en el mismo medio durante 20 min en presencia de dihidrorodamina (DHR, FL1) o de hidroetidina (HE, FL3), ambos reactivos a una concentración de 2,5 μ M. La fluorescencia se determinó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. A la izquierda se muestran “dot plots” e histogramas representativos de esos experimentos. El gráfico a la derecha muestra la media y la desviación estándar de la fluorescencia emitida por cada fluorocromo (en unidades relativas de fluorescencia, RFU), con los valores (en porcentaje) referidos a los respectivos valores obtenidos con el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Las diferencias con el valor obtenido para cada fluoróforo en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^{***} < 0,005$.

Por lo tanto y como conclusión de este apartado podemos decir que la glucosa del medio de Krebs-Henseleit no sólo no aumenta los niveles de ROS, sino que incluso tiene un cierto papel citoprotector que previene el aumento de ROS producido en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, por lo que descartamos que la inducción de la autofagia por glucosa sea debida a una respuesta frente al estrés oxidativo.

4.3.2. LA GLUCOSA NO EJERCE NINGÚN PAPEL EN LA INDUCCIÓN DE LA SUPERVIVENCIA CELULAR POR LA AUTOFAGIA

En el apartado anterior hemos comprobado que la ausencia de glucosa produce un incremento en los niveles de ROS. Un aumento de los niveles de ROS afecta al correcto funcionamiento de

los procesos celulares y consecuentemente compromete la supervivencia celular (Marchi *et al.*, 2012). A continuación, nos planteamos si la privación de glucosa reduce la viabilidad celular con respecto a la incubación con glucosa. Alternativamente, debido a que la autofagia puede ser un proceso que favorece la supervivencia de la célula comprobamos si la inhibición de dicho proceso proteolítico repercute de alguna forma a la viabilidad celular.

Debido a que el estudio de la viabilidad celular dependiente de glucosa no es el tema principal de la presente tesis, abordamos brevemente la cuestión a través de la detección por “Western-blot” de los fragmentos de las proteínas PARP y caspasa-3 resultantes del proceso apoptótico y a través de la cuantificación por citometría de flujo de las células positivas a yoduro de propidio y anexina A5-FITC.

En primer lugar, en la FIGURA 19A puede verse que tras 2 h de incubación en un medio Krebs-Henseleit no existen diferencias en la detección de los fragmentos escindidos de la proteína PARP ni de caspasa-3 tanto en presencia de glucosa como sin glucosa.

Para cuantificar de manera más precisa la posible inducción de la muerte celular en las condiciones ensayadas empleamos la citometría de flujo. En la FIGURA 19B se representa el porcentaje de células positivas al yoduro de propidio, es decir aquellas células muertas por necrosis o apoptosis tardía. Observamos que la mortalidad celular es similar tanto en las células tratadas con glucosa como sin ella en un medio Krebs-Henseleit. Esto indica que la incubación de las células en un medio tan pobre en nutrientes como lo es el medio Krebs-Henseleit sin glucosa durante dos horas y media, donde se da un incremento de los niveles de ROS, no supone una inducción de la muerte celular respecto al mismo medio con glucosa.

Por otra parte, la autofagia puede cumplir la función de un proceso que fomenta la supervivencia o, por el contrario, que induce la muerte celular (Codogno & Meijer, 2005). Así que la inhibición de la autofagia puede llevar a la muerte celular. En las mismas condiciones ensayadas de la FIGURA 19B, se incubaron las células además con los inhibidores lisosomales cloruro amónico y leupeptina. En esos experimentos, tras la adición de anexina A5-FITC y de yoduro de propidio, se determinó la fluorescencia por citometría de flujo. En la FIGURA 19C se representan los porcentajes de todas las células positivas a anexina A5-FITC, marcadas o no con yoduro de propidio, lo que indica el porcentaje de células en apoptosis temprana o tardía. Las células con la proteólisis lisosomal inhibida por cloruro amónico y leupeptina sufren una mayor inducción de la apoptosis que aquellas en las que la degradación lisosomal se desarrolla normalmente. Además, al plantearnos la cuestión si la mayor inducción de la autofagia por el

tratamiento con glucosa puede reflejar una mayor protección celular, vemos que el grado de apoptosis durante la inhibición de la autofagia por cloruro amónico y leupeptina es similar en las células tratadas con glucosa o sin ella.

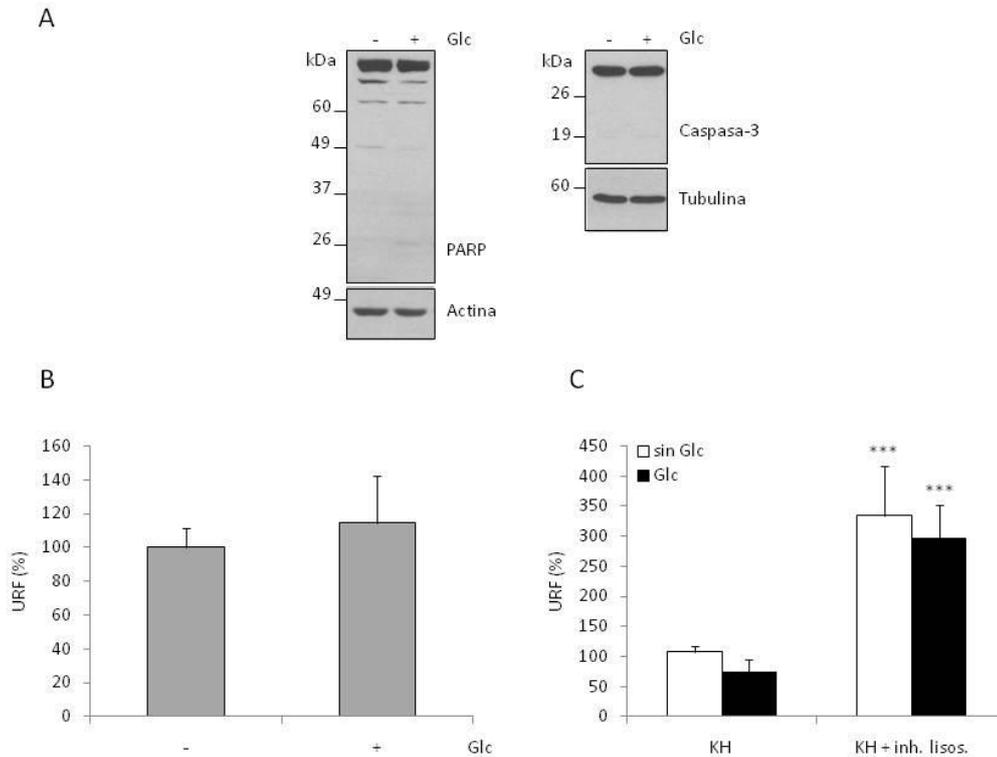


FIGURA 19. La autofagia favorece la supervivencia celular pero independientemente de la glucosa.

Las células NIH/3T3 se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min. **A)** Después, las células se incubaron durante 2 h en presencia o ausencia de glucosa, se recogieron en tampón RIPA para su lisis, se separaron las proteínas por SDS-PAGE y se detectaron las proteínas PARP y caspasa-3 por “Western-blot” con anticuerpos específicos. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos. Se indica a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes al fragmento principal de PARP y de caspasa-3, así como la actina y la tubulina. **B-C)** Tras la incubación inicial de 30 min, se añadieron, o no, al medio de incubación de las células inhibidores de la proteólisis lisosomal (Inh. lisos.) y/o glucosa (Glc, 10 mM) y se incubaron las células durante 2 h más. Las células se recogieron en tripsina, se resuspendieron en tampón HBS y se incubaron con anexina A5-FITC y con yoduro de propidio. La fluorescencia emitida por cada fluorocromo proporciona información sobre el porcentaje de células vivas y apoptóticas. En el histograma **B)** se representan las medias y las desviaciones estándar de la cuantificación de las células muertas teñidas con yoduro de propidio, mientras que en el histograma **C)** se representan las medias y las desviaciones estándar de la cuantificación de las células positivas a la anexina A5-FITC (apoptóticas o muertas). Los histogramas se expresan en unidades relativas de fluorescencia (URF) referidas (en porcentaje) a los valores obtenidos en ausencia de glucosa y de inhibidores lisosomales (11,9 % ± 3,4 en **(B)** y 4,6 % ± 2 en **(C)**), a partir de tres experimentos independientes. Las diferencias con el valor obtenido en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^{***} < 0,005$.

Por tanto, los resultados expuestos muestran que la ausencia o presencia de glucosa no tiene ningún efecto en la supervivencia de las células y que en ambas condiciones el bloqueo de la autofagia produce un incremento en la muerte celular. Por tanto, el efecto de la autofagia en la supervivencia de las células es independiente de la glucosa.

4.3.3. LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA DEPENDE DEL ATP PRODUCIDO

La autofagia requiere energía en diferentes pasos del proceso: durante la formación de la membrana autofagosomal para iniciar el secuestro de porciones de citoplasma, en la activación de LC3 por la enzima similar a una E1, la Atg7 (Gurusamy *et al.*, 2009), y en el mantenimiento de la acidez de los lisosomas por medio de las V-ATPasas (di Ciccio & Steinberg, 2011). Es posible por tanto que el incremento de la autofagia producido por la glucosa se deba a la generación de energía.

Para verificar esto cuantificamos, en primer lugar, los niveles de ATP en las células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit con diferentes concentraciones de glucosa o sin ella y tratamos después de relacionar esos niveles con los de la proteína LC3-II.

4.3.3.1. La glucosa produce un incremento de los niveles de ATP en las células incubadas en medio de Krebs-Henseleit con glucosa respecto el mismo medio sin glucosa

Los niveles de ATP en las células se determinaron por un método estándar, añadiendo luciferina-luciferasa a los extractos celulares (ver Materiales y Métodos) obtenidos tras 2 h de incubación en el medio de Krebs-Henseleit con diferentes concentraciones de glucosa (1-10 mM). Como puede verse en la FIGURA 20A, las células NIH/3T3 tratadas con concentraciones crecientes de glucosa muestran, como era de esperar, un incremento progresivo de la concentración de ATP. La concentración máxima de este nucleótido en las condiciones de nuestro experimento se alcanzó en las células tratadas con 5 y 10 mM de glucosa y suponía, aproximadamente, un incremento del 50 % de la concentración que existía en las células que no dispusieron del azúcar durante el experimento.

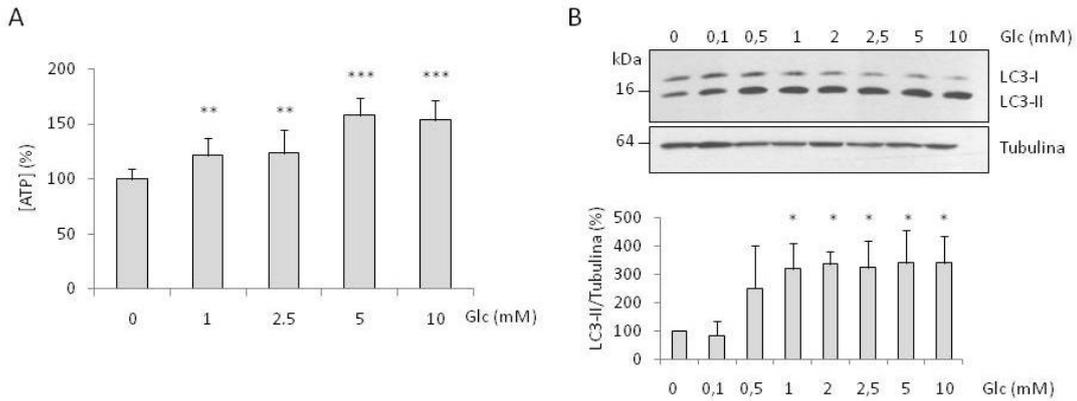


FIGURA 20. Concentraciones crecientes de glucosa aumentan los niveles de ATP y de LC3-II.

Las células se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, al que se le añadieron después diferentes concentraciones de glucosa (Glc) según se indica. **A)** Las células se recogieron, se lisaron y a cada extracto se le añadió la mezcla luciferina-luciferasa que, al reaccionar con el ATP de la muestra, emitió una señal luminiscente. El diagrama de barras muestra la media y la desviación estándar de los datos obtenidos de tres experimentos independientes con los valores (en porcentaje) referidos a los del medio de Krebs-Henseleit sin glucosa ($10,71 \pm 0,99 \mu\text{moles/g}$). **B)** Las células, incubadas en presencia de inhibidores de la proteólisis lisosomal (NH_4Cl 20 mM y leupeptina 100 μM), se recogieron con el tampón RIPA, se vortearon y se obtuvieron los extractos celulares que se procesaron electroforéticamente y por “Western-blot” para detectar los niveles de LC3-II. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y tubulina. El histograma de abajo representa la media y la desviación estándar de la cuantificación de LC3-II respecto a la tubulina, que se empleó como control de carga, de tres experimentos independientes. Los valores (en porcentaje) están referidos a los del medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. En **(A)** y **(B)**, las diferencias con el valor obtenido en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$ y $P^{***} < 0,005$.

4.3.3.2. La energía procedente de la glucosa induce la autofagia

Para comprobar que la energía suministrada por el metabolismo de la glucosa induce la autofagia, incubamos las células NIH/3T3 durante 2 h en el medio de Krebs-Henseleit con diferentes concentraciones de glucosa que, como hemos visto (FIGURA 20A), producen diferentes niveles de ATP, y determinamos los niveles de la proteína LC3-II que, en presencia de inhibidores de la proteólisis lisosomal, son indicativos de la cinética de formación de autofagosomas. La FIGURA 20B muestra que los niveles de LC3-II obtenidos a una concentración de glucosa de 0,1 mM fueron similares a los que se obtuvieron en ausencia de esta. Sin embargo, entre esa concentración y la de 1 mM de glucosa se produce un incremento brusco en los niveles de LC3-II (a 1 mM de hasta tres veces sobre los niveles que se producían a la concentración de 0,1 mM de glucosa). A partir de esa concentración, estos niveles se mantienen ya constantes en las concentraciones superiores de glucosa ensayadas (hasta 10

mM). Como los niveles de LC3-II a una concentración de glucosa aproximada de 0,5 mM son casi tres veces más de los observados a 0,1 mM, es posible que el aumento observado de LC3-II, y por tanto del flujo autofágico (ya que estas medidas están hechas en presencia de inhibidores lisosomales), comience a concentraciones de glucosa próximas a 0,5-1 mM. Puesto que en la misma condición de 1 mM de glucosa ocurre un incremento de los niveles de ATP de aproximadamente el 20 % respecto a la ausencia de glucosa, debe existir un estrecho umbral de energía a partir del cual se induce la autofagia. Es decir, si fuera únicamente la producción de ATP por la glucosa lo que estimula la autofagia, un aumento en los niveles de ATP de un 20 % respecto a los niveles de energía en un medio de Krebs-Henseleit sin glucosa sería suficiente para activar la formación máxima de autofagosomas, al menos en cuanto a lo que se puede determinar a partir de los niveles de LC3-II.

Para comprobar que el aumento en la concentración de ATP producido por la glucosa era realmente el factor responsable de la activación de la autofagia, se inhibió la producción de energía por la glucosa y se observaron los niveles de LC3-II. Recurrimos al oxamato de sodio, un análogo del piruvato e inhibidor competitivo de la enzima lactato deshidrogenasa (Odet *et al.*, 2011), que bloquea la regeneración, a partir del NAD^+ , del NADH, un cofactor que es necesario para que transcurra la glucólisis. En la FIGURA 21A se muestra como el tratamiento con concentraciones crecientes de oxamato de sodio (5-100 mM) supuso un descenso gradual del contenido de ATP. A concentraciones de oxamato de 50 y 100 mM, los niveles de ATP descendieron hasta llegar a un 40-60 % respecto a los niveles obtenidos en presencia de una concentración de glucosa de 10 mM. Este descenso es similar al observado en las células que pasan de un medio de Krebs-Henseleit con glucosa (10 mM) a uno sin glucosa, lo que indicaría que el incremento de ATP inducido por la glucosa se debe principalmente a la glucólisis. Cuando se cuantificaron los niveles de LC3-II en las células tratadas con oxamato de sodio se observó que la autofagia inducida por la glucosa disminuía gradualmente al aumentar la concentración del oxamato (FIGURA 21B). Así, a concentraciones de oxamato de 50 y 100 mM los niveles de LC3-II observados fueron equivalentes a los obtenidos en células incubadas únicamente en un medio de Krebs-Henseleit sin glucosa.

Estos resultados nos indican que el incremento de ATP observado en las células incubadas con glucosa se debe al metabolismo de este azúcar y que esta mayor disponibilidad energética es necesaria para la inducción de la autofagia.

La autofagia requiere energía pero, como proceso catabólico que es, también la genera a partir de los metabolitos que produce. Esta capacidad productora de ATP es una de las principales

funciones de la autofagia, que es inducida cuando la célula se encuentra bajo una situación de crisis energética, como puede serlo, por ejemplo, la privación de glucosa en el medio de incubación. A continuación quisimos comprobar en qué grado contribuye la inducción de la autofagia por glucosa a los niveles de ATP en la célula.

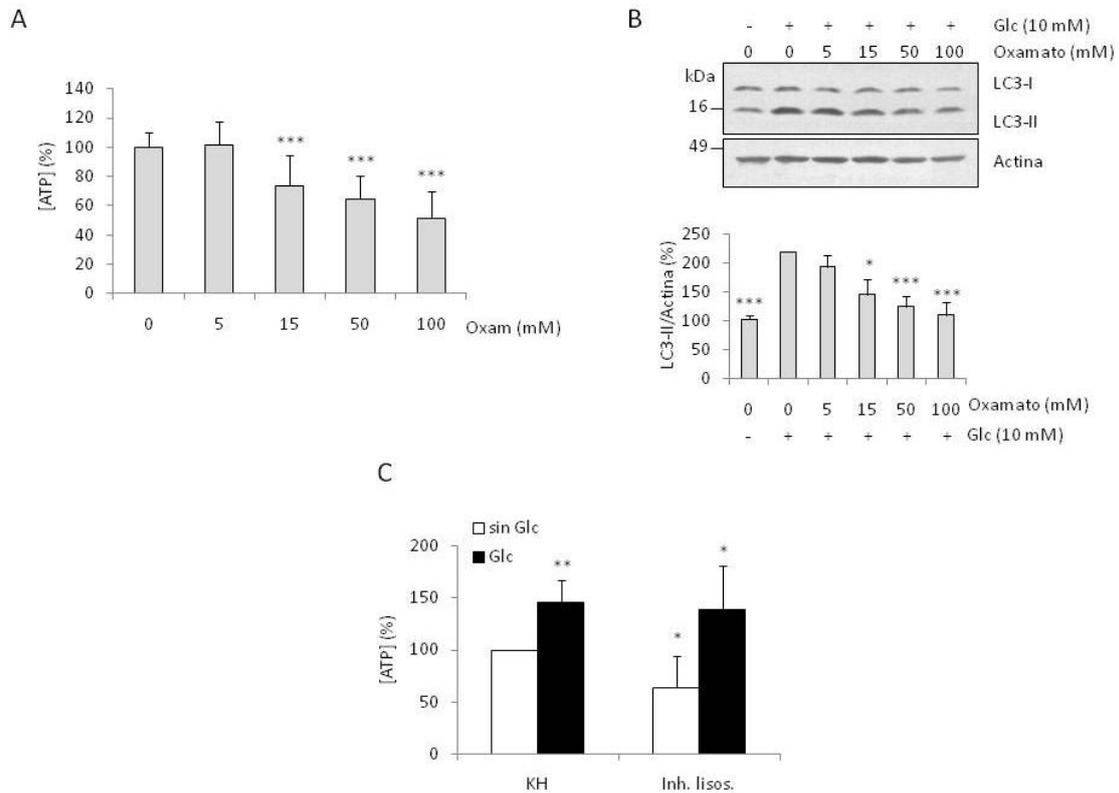


FIGURA 21. La inhibición de la glucólisis con oxamato reduce los niveles de ATP y de LC3-II dependientes de glucosa.

A) Las células se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit que contiene glucosa (Glc, 10 mM), al que se le añadieron, o no, diferentes concentraciones de oxamato de sodio (Oxam, 5-100 mM) durante 2 h más. Después, las células se recogieron y se lisaron. Finalmente, se añadió una mezcla de luciferina-luciferasa a cada extracto para cuantificar los niveles de ATP por luminiscencia. Los niveles de ATP se representan en porcentaje respecto al valor obtenido en el medio de Krebs-Henseleit ($12,3 \pm 1,1$ μ moles/g) y son la media y la desviación estándar de, al menos, tres experimentos independientes. **B)** La incubación fue la misma que en **(A)**, pero añadiendo los inhibidores de la proteólisis lisosomal (NH_4Cl 20 mM y leupeptina 100 μ M) antes de la última incubación de 2 h. Las células se lisaron en el tampón RIPA, se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectaron las proteínas LC3 y actina (como control de carga) con anticuerpos específicos. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. Los valores en los histogramas de abajo representan la media y la desviación estándar de los niveles de LC3-II respecto a los de actina de tres experimentos independientes y se expresan en porcentaje respecto a los del medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. **C)** Las células NIH/3T3 se incubaron durante 2 h en presencia o en ausencia de glucosa y con o sin inhibidores de la proteólisis lisosomal (NH_4Cl 20 mM y leupeptina 100 μ M). Después, se recogieron y se obtuvieron los extractos celulares y se determinó el contenido de ATP como en **(A)**. La figura representa la media y la desviación estándar de los niveles de ATP de tres experimentos independientes y se expresan en porcentaje respecto al valor obtenido en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa ($9,7 \pm 0,5$ μ moles/gr). En **(A)** y **(B)** las diferencias con el valor obtenido en ausencia de oxamato y con glucosa fueron significativas con $P^* < 0,05$, $P^{**} < 0,01$ y $P^{***} < 0,005$. En **(C)** las diferencias con el valor obtenido en ausencia de glucosa e inhibidores lisosomales fueron significativas con $P^* < 0,05$ y $P^{**} < 0,01$.

Para verificar si la proteólisis lisosomal contribuía de manera significativa a los niveles de ATP en las células en las condiciones de los experimentos, se incubaron las células durante 2 h en el medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa y se inhibió, o no, la proteólisis lisosomal con cloruro amónico y leupeptina. Si existe un descenso en los niveles de ATP en la condición en la que se inhibe la autofagia respecto a la condición en la que la autofagia funciona normalmente, suponemos que la actividad autofágica proporciona energía a la célula en esas condiciones. En la FIGURA 21C podemos ver que, independientemente de que se inhiba o no la proteólisis lisosomal, la glucosa aumenta los niveles de ATP respecto a los de las células privadas de glucosa. Sin embargo, en las células incubadas sin glucosa el ATP se redujo en aproximadamente un 40 % en presencia de los inhibidores lisosomales, mientras que estos no tenían ningún efecto sobre esos niveles en las células incubadas con glucosa. Esto es posiblemente así porque la glucosa a una concentración de 10 mM suministra suficiente energía como para compensar la que se pierde al inhibir la autofagia.

Como hemos visto, no puede darse la autofagia sin un aporte inicial de energía. Esto permite a la célula estimular la autofagia cuando los niveles de ATP descienden con el objetivo de incrementar la disponibilidad energética. Por el contrario, si existen unos niveles de ATP que no son suficientes para que se desarrolle la autofagia, esta no ocurre finalmente. Podemos concluir que la privación de glucosa reduce la autofagia de forma importante por un descenso de los niveles de ATP. Además, el tratamiento con inhibidores lisosomales produce un mayor descenso del contenido energético debido a que la autofagia, además de requerir energía para que se desarrolle, contribuye a la generación de energía a partir de la descomposición de orgánulos y macromoléculas.

En resumen, los resultados de este apartado permiten concluir que la energía proporcionada por la glucosa juega un papel muy importante en la inducción de la autofagia por este azúcar.

4.4. POSIBLES VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

La adición de glucosa al medio de Krebs-Henseleit induce la formación de autofagosomas. Cuando se ha analizado el efecto de otras señales que también afectan a la autofagia, como las hormonales (por ejemplo insulina y glucagón) y las nutricionales (por ejemplo aminoácidos), se ha podido identificar una red de vías de señalización que responden a las mismas y que es especialmente compleja en el caso de los aminoácidos (He & Klionsky, 2009). Por tanto, nos

planteamos ahora averiguar si la glucosa emplea, directa o indirectamente, alguna vía de señalización para activar la autofagia.

Como se ha mencionado arriba, la inducción de la autofagia por la glucosa depende de los niveles de ATP disponible en la célula. Esto nos llevó inicialmente a pensar que en esa vía de señalización podría desempeñar un importante papel AMPK, ya que es el principal sensor energético de la célula y se sabe que cuando se activa induce la autofagia. Por otra parte, es bien sabido que mTORC1 es la proteína reguladora más importante en el control de la autofagia, una regulación en la que para ejercer su papel inhibitor sobre la autofagia puede competir con AMPK. Por todo esto nos planteamos, en primer lugar, averiguar si alguna de esas dos quinasas, es decir AMPK o mTORC1, podía desempeñar un papel en el efecto que habíamos observado que tenía la glucosa sobre la autofagia.

4.4.1. ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE AMPK EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

AMPK es una quinasa especialmente sensible a los cambios en la relación AMP/ATP. Cuando existen condiciones de menor disponibilidad energética, la concentración de AMP aumenta respecto a la de ATP. La molécula de AMP se une a AMPK y esto produce un cambio conformacional que hace susceptible a esa quinasa a la fosforilación en su residuo de Thr172 por la quinasa LKB1 (Hardie, 2005; Shaw *et al.*, 2004b). Asimismo, esta fosforilación ocurre cuando aumentan los niveles citosólicos de calcio por la CaMKK β (Green *et al.*, 2011) y, menos frecuentemente, por la CaMKK α (Witczak *et al.*, 2005). Además se han descrito también otras quinasas que pueden fosforilar a AMPK (Witters *et al.*, 2006). Esta fosforilación de AMPK en el residuo Thr172 determina su activación, lo que le permite fosforilar diversos sustratos, algunos de los cuales se han detallado en la Introducción.

La relación entre AMPK y la autofagia es ya bien conocida. La activación de AMPK se traduce en una estimulación de la autofagia, generalmente a través de la inhibición de la quinasa represora de la autofagia mTORC1 por dos vías distintas (directamente y a través del complejo TSC1/TSC2) y también a través de la fosforilación directa de una proteína muy importante para la autofagia, Ulk1, en los residuos de Ser317 y Ser777 (Alers *et al.*, 2012). De esta forma, se constituye el complejo Ulk1-Atg13-FIP200 que actúa como un inductor de la autofagia (Kim *et al.*, 2011b) (FIGURA 22).

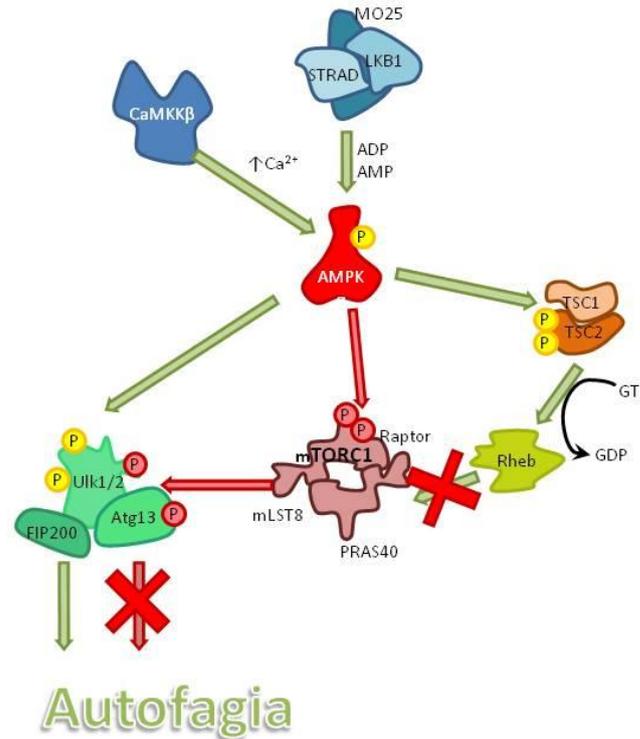


FIGURA 22. Esquema del mecanismo de regulación de la autofagia por AMPK y mTORC1.

La fosforilación de LKB1 (Ser428) en el complejo que forma junto con STRAD y MO25 es necesaria para su translocación desde el núcleo al citoplasma, donde activa por fosforilación a AMPK (Thr172). AMPK también puede fosforilarse en el mismo residuo por la CaMKKβ, que es activada por condiciones en las que los niveles de Ca⁺⁺ aumentan. AMPK induce la autofagia a través de la fosforilación de Ulk1 en la Ser317 y la Ser777, un cambio que permite la activación del complejo Ulk1-Atg13-FIP200 que es necesario para la inducción de la autofagia. AMPK también ayuda a inducir la autofagia bloqueando mTORC1 a través de dos vías: por la fosforilación de Raptor (Ser722/792), una subunidad del complejo mTORC1, o por la fosforilación de la GTPasa TSC2 (en Thr1227 y Ser1345) que forma un complejo con TSC1. El complejo TSC1/2 inhibe mTORC1 a través la inhibición de Rheb que es necesaria para activar a mTORC1. El resultado de esa inhibición de mTORC1 es que esta quinasa no puede fosforilar a Ulk1 en su Ser757 ni a la proteína Atg13, algo que de producirse impediría que se activase el complejo Ulk1-Atg13-FIP200 y, por tanto, inhibiría la autofagia.

De acuerdo con lo anterior y para comprobar si AMPK estaba implicada en la vía de señalización que regula la autofagia estimulada por la presencia de glucosa estudiamos su fosforilación y también la de su quinasa LKB1 y la de su sustrato ACC (acetil CoA carboxilasa). La FIGURA 23A muestra que cuando las células NIH/3T3 se incubaron durante 2 h en un medio de Krebs-Henseleit privado de glucosa se producía una mayor fosforilación tanto de AMPK en el residuo Thr172 como de su quinasa LKB1 en el residuo Ser428 y de su sustrato ACC en el residuo Ser79. Esto sugiere que, en ausencia de glucosa, AMPK es fosforilada por la quinasa LKB1 y que, a su vez, AMPK fosforila a su sustrato ACC. Por el contrario, la adición de glucosa al medio incrementa los niveles energéticos de la célula, por lo que la relación AMP/ATP disminuye y se inhibe la fosforilación de AMPK, probablemente al disminuir la activación de la

quinasa LKB1 (cuya fosforilación disminuye). En esas condiciones, al no estar AMPK fosforilada, su actividad disminuye y la fosforilación de su sustrato, ACC, se reduce notablemente.

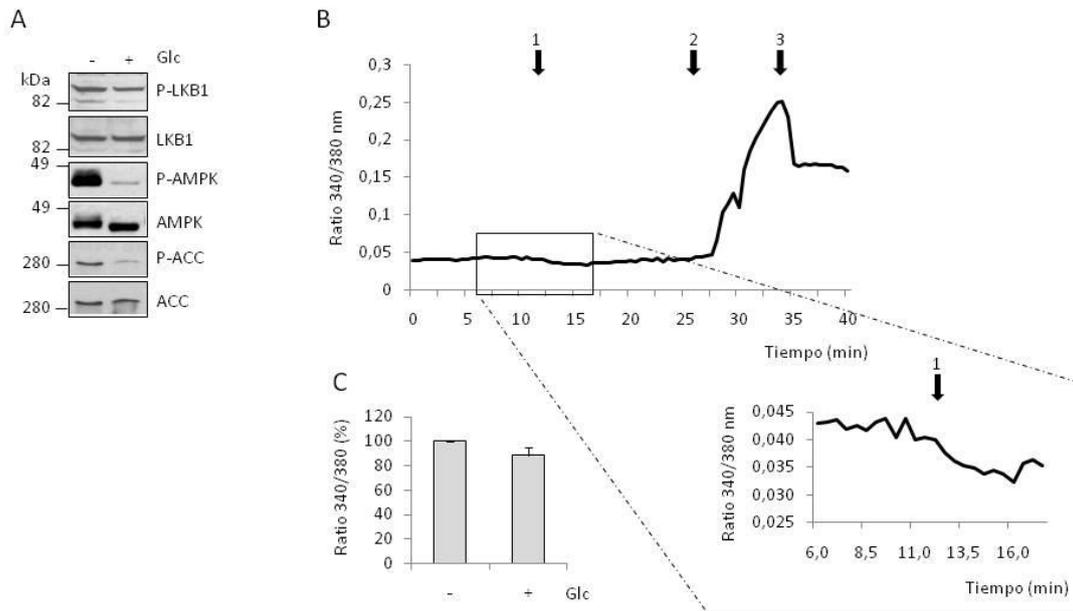


FIGURA 23. La privación de glucosa fosforila AMPK y aumenta ligeramente la concentración citosólica de calcio.

A) Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Transcurrido ese tiempo, se añadió, o no, glucosa (Glc, 10 mM) al medio y las células se incubaron durante 2 h más. Las células se recogieron en un tampón de lisis celular con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa cuya composición se detalla en Materiales y Métodos. El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 10 min y las proteínas de los sobrenadantes se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida, se transfirieron a membranas de PVDF y se identificaron con anticuerpos específicos que reconocen las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de LKB1, AMPK y ACC. La figura muestra imágenes representativas de diferentes experimentos. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las diferentes proteínas, fosforiladas y no fosforiladas. **B)** Las células se sembraron sobre cubreobjetos previamente tratados con gelatina porcina y después esterilizados y se mantuvieron en medio DMEM con suero bovino fetal hasta que alcanzaron una confluencia de aproximadamente un 60 %. Se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 1 h y, en los últimos 20 min, se añadió FURA-2AM (5 μ M). Posteriormente, los cubreobjetos se ubicaron en una cámara de inmersión acoplada a un microscopio de fluorescencia que permitía seguir, en tiempo real, los cambios en los niveles de calcio citosólico inducidos por los diferentes tratamientos. En la figura se representan los niveles de calcio expresados por la relación de fluorescencias emitidas a 510 nm después de que el FURA se haya excitado a 340 y 380 nm (Ratio 340/380). Los números y las flechas indican los momentos en los que se procedió a realizar las diferentes adiciones al medio de Krebs-Henseleit: 1) glucosa 10 mM, 2) ionomicina 1 μ M y 3) EGTA 8 μ M. Abajo se muestra también, a mayor aumento, el cambio producido por la adición de glucosa. **C)** El diagrama representa la media y la desviación estándar, a partir de tres experimentos independientes, de los niveles relativos de calcio existentes en las células en dos momentos puntuales, correspondientes al medio de Krebs-Henseleit sin o con glucosa y expresados en porcentaje respecto al valor obtenido en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa.

Otra quinasa, CaMKK β , también regula por fosforilación la actividad de AMPK. CaMKK β se une a la proteína calcio/calmodulina cuando existe un incremento de la concentración intracelular de calcio. De esta forma, CaMKK β sufre un cambio de conformación que la vuelve activa catalíticamente y le permite formar un complejo con AMPK y de esta forma CaMKK β fosforila a AMPK en la Thr172 (Green *et al.*, 2011). Por ello, quisimos comprobar si el tratamiento con glucosa inducía cambios en la concentración intracelular de calcio y con ello que AMPK pudiese ser fosforilada por CaMKK β .

En la FIGURA 23B se representan los niveles de calcio determinados con la sonda FURA-2AM, que emite fluorescencia a 510 nm después de haber sido excitado a las longitudes de onda de 340 y 380 nm, dependiendo de si está o no, respectivamente, unida al calcio. En la figura, estos niveles están expresados por la relación de las fluorescencias emitidas a ambas longitudes de onda. En estos experimentos, se sometieron las células, de forma alternada, a un medio con y sin glucosa y se cuantificaron, en tiempo real, las relaciones de las medidas de fluorescencia a 340 y 380 nm. Como controles se utilizó la ionomicina, que induce una entrada masiva de calcio desde el medio extracelular, y el EGTA, un quelante del calcio. Comprobamos que la glucosa produce un pequeño descenso en los niveles de calcio respecto al observado en las células privadas de glucosa. Esto se debe probablemente a la existencia de bombas de calcio dependientes de ATP y que cuando falta esta molécula se produce una acumulación de calcio citosólico ante la incapacidad de expulsarlo de la célula o de incorporarlo al retículo endoplásmico o a otros almacenes celulares a través de esas bombas. En presencia de glucosa, las bombas de calcio funcionan por medio del ATP producido y disminuyen así el calcio citosólico. De la misma forma, la retirada de la glucosa incrementó los niveles de calcio en aquellas células tratadas previamente con glucosa (datos no mostrados), probablemente debido a que la actividad de las bombas de calcio disminuye en esas condiciones y eso se traduce en un aumento del calcio citosólico.

En resumen pues, AMPK muestra una mayor actividad en las células privadas de glucosa y esta actividad está regulada por LKB1 y, posiblemente, también por CaMKK β . Puesto que AMPK es considerada un inductor de la autofagia y hemos observado aquí que su activación ocurre en condiciones de privación pero no en presencia de glucosa, que es donde hemos demostrado que se activa la autofagia, podemos, en principio, descartar que AMPK esté implicada en la vía de señalización por la que la glucosa aumenta la autofagia.

4.4.2. ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE LA QUINASA mTORC1 EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

Mientras que la quinasa AMPK es considerada un sensor de energía, la quinasa mTORC1, que también regula de manera importante la autofagia, se considera sobre todo un sensor de nutrientes. La quinasa mTORC1 interviene de manera destacada en el control de la autofagia por la insulina y también, al menos en parte, por aminoácidos (Suzuki & Inoki, 2011). En cuanto a su efecto concreto sobre la autofagia, se sabe que cuando se activa mTORC1 se inhibe la autofagia. Siguiendo con la identificación de las posibles vías de señalización por las que la glucosa podría regular la autofagia, comprobamos ahora si mTORC1 estaba implicada en la regulación de la autofagia dependiente de glucosa (FIGURA 24).

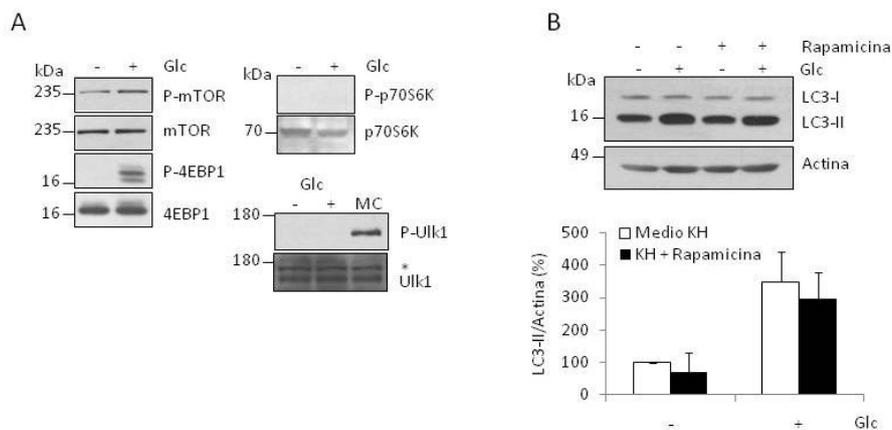


FIGURA 24. La glucosa incrementa la fosforilación de 4EBP1 y de mTORC1, pero no la de p70S6K ni la de Ulk1. Además, el tratamiento con rapamicina no afecta significativamente al aumento de los niveles de LC3-II dependientes de glucosa.

A) Las células NIH/3T3 se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa durante 30 min. Después se añadió glucosa (Glc, 10 mM) al medio según se indica y la incubación se prolongó 2 h más. Las células se recogieron, se lisaron y los lisados se trataron como se indica en la leyenda de la FIGURA 23A, excepto que los anticuerpos específicos utilizados aquí fueron los que reconocen a las proteínas fosforiladas y no fosforiladas mTORC1, 4EBP1, p70S6K y Ulk1. Para mostrar la fosforilación de Ulk1, se ha incluido en el correspondiente “Western-blot” una incubación de las células con medio completo (MC). El asterisco indica una banda no específica que reconoce el anticuerpo de Ulk1 y también se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas mTORC1, 4EBP1, p70S6K y Ulk1, fosforiladas y no fosforiladas. **B)** Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit (KH) sin glucosa y con o sin el inhibidor de mTORC1 rapamicina (200 nM). Después, se añadió, o no, glucosa (Glc, 10 mM) con o sin inhibidores de la proteólisis lisosomal (NH₄Cl 20 mM y leupeptina 100 μM) y se realizó una nueva incubación de 2 h. Las células se recogieron en el tampón RIPA y las muestras se separaron electroforéticamente en geles de acrilamida. Los niveles de LC3-II y, como control de carga, de actina se detectaron con el uso de anticuerpos específicos. En la gráfica se muestran las medias y las desviaciones estándar de la relación LC3-II/Actina, calculadas a partir de tres experimentos independientes y expresadas en porcentaje respecto al valor obtenido en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa ni rapamicina.

Debido a que la activación de mTORC1 por la presencia de aminoácidos muestra una fosforilación del residuo de Ser2448, lo que permite su unión a Raptor y Rictor (Rosner *et al.*, 2010), nos planteamos comprobar si la glucosa también induce la fosforilación de mTORC1 en ese residuo. Asimismo, también estudiamos la posible fosforilación de tres de los sustratos de mTORC1, p70S6K, 4EBP1 y Ulk1.

La fosforilación de mTORC1 (Ser2448) y de uno de sus sustratos, 4EBP1 (Thr37/46), es mayor en presencia de glucosa que en su ausencia (FIGURA 24A). Si tenemos en cuenta que mTORC1 es una represora de la autofagia cuando está activa y que nuestros resultados indican que es en presencia de glucosa cuando mTORC1 muestra más fosforilación en la Ser2448, esto no parece concordar con la activación observada de la autofagia por la glucosa, ya que el efecto de mTORC1 sería precisamente el contrario. Además, la fosforilación de otros sustratos de mTORC1, como p70S6K y, sobre todo, de Ulk1 (en la Ser757, cuya fosforilación es indicativa de la actividad de mTORC1 y que, además, estaría directamente relacionada con una inhibición de la autofagia) no aumentan. Esto indica que mTORC1, a pesar de estar fosforilada en la Ser2448 y de aumentar la fosforilación de uno de sus sustratos en presencia de glucosa, no produce un efecto inhibitorio sobre la autofagia durante la incubación en el medio de Krebs-Henseleit tal y como muestran nuestros resultados. Esto sería probablemente debido a que mTORC1, a pesar de estar activada, no fosforila Ulk1 en la Ser757, de forma que no inhibe el complejo formado por Ulk1, Atg13 y FIP200 que es un inductor de la autofagia (Hosokawa *et al.*, 2009).

Para comprobar la posible implicación de mTORC1, utilizamos también el inhibidor específico de esa quinasa, la rapamicina. En la FIGURA 24B se muestra un gel representativo de los niveles de LC3-II en condiciones de presencia y ausencia de glucosa y con o sin rapamicina, así como la cuantificación de varios de esos gels. Si en las condiciones de nuestros experimentos mTORC1 reprimiera la autofagia, debería observarse un incremento en los niveles de LC3-II tras el tratamiento con rapamicina. Sin embargo, observamos que el inhibidor de mTORC1 no tiene ningún efecto significativo sobre LC3-II, lo que nos indica que mTORC1 no ejerce ningún control sobre la autofagia en las células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit, independientemente de que este contenga o no glucosa.

De los resultados expuestos hasta aquí, concluimos que ninguna de las dos quinasas que desempeñan un papel importante en la regulación de la autofagia, es decir las quinasas AMPK y mTORC1, parecen intervenir en el control de la autofagia dependiente de glucosa. Por tanto, deben existir otras vías de señalización que expliquen esa activación.

4.4.3. ANÁLISIS DEL POSIBLE PAPEL DE OTRAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN EN LA ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA

Como se ha descrito en la Introducción, además de mTORC1 y AMPK existen otras muchas proteínas, bastante menos estudiadas, que intervienen en otras vías de señalización que regulan la autofagia, tanto estimulándola como inhibiéndola. Esto determina que la regulación de la autofagia sea un proceso de gran complejidad. De entre todas las proteínas que podrían tener un papel en esa regulación seleccionamos, por las razones que se exponen inmediatamente a continuación, a la proteína PKA y a dos MAP quinasas, ERK1/2 y p38, para investigar si pudieran estar implicadas en la activación de la autofagia por la glucosa. En levaduras se ha descrito que la activación de PKA en presencia de glucosa desempeña un importante papel en la regulación de la autofagia al inhibir el complejo Atg1-Atg13-Atg17 (Nazarko *et al.*, 2008a). Sin embargo, esta relación no se ha descrito de momento en mamíferos. Por otro lado, por lo que se refiere a las MAP quinasas ERK1/2 y p38, que normalmente responden al estrés oxidativo, existen también datos acerca de que esas dos MAPK regulan la autofagia, aunque los datos son bastante contradictorios en cuanto a su efecto concreto (ver Introducción).

Para investigar la posible implicación de esas tres quinasas en la regulación de la autofagia por la glucosa empleamos, en una primera aproximación, inhibidores específicos de las mismas. Estos se añadían a las células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa y se analizaban en cada condición los niveles del marcador de autofagia LC3-II. De esta forma, si una de estas proteínas interviene en la inducción de la autofagia por la glucosa su inhibición se traducirá en un menor aumento de esos niveles en presencia de glucosa.

En la FIGURA 25 se representan los niveles de LC3-II de células incubadas en un medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa y tratadas con los inhibidores correspondientes: KT5720 para PKA, PD98059 para ERK1/2 y SB203580 para p38 (paneles **(A-C)**). También incluimos como control negativo el inhibidor de PI3K, LY294002, panel **(D)**, ya que es bien conocido que la actividad de la PI3K de clase III es necesaria para el inicio de la autofagia.

Como era de esperar, la inhibición de PI3K anuló casi por completo el aumento de LC3-II inducido por la glucosa (FIGURA 25D). En cuanto a PKA, su inhibición no supuso ningún cambio en los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa (FIGURA 25A). En cambio, la inhibición de ERK1/2 llevó a un descenso de aproximadamente un 20 % en los niveles de LC3-II, tanto en presencia como en ausencia de glucosa (FIGURA 25B). Al inhibir p38, se produjo una reducción

significativa (50 %) en los niveles de LC3-II en presencia de glucosa (FIGURA 25C). Por tanto, parece que las dos MAPK, ERK1/2 y p38, pero sobre todo la última, podrían estar implicadas en la regulación de la autofagia por la glucosa. Sin embargo, si analizamos más detenidamente estos resultados comprobamos que con el inhibidor PD98059 (FIGURA 25B) la relación de los niveles de LC3-II en presencia de glucosa respecto a los niveles de LC3-II en su ausencia es de aproximadamente 3,9, un valor similar a la misma relación en condiciones control. Es decir, que la inhibición de ERK1/2 supone un descenso, aunque no es significativo, de los niveles de LC3-II, tanto en condiciones de presencia como de ausencia de glucosa. Por ello, la inducción de la autofagia producida específicamente por glucosa no parece producirse a través de ERK1/2, aunque posiblemente esta proteína quinasa tenga un papel sobre la regulación de la autofagia. En cambio, inhibiendo la MAPK p38 con SB203580 en presencia de glucosa la relación anterior es de aproximadamente 2,3 veces, claramente por debajo de la relación obtenida en ausencia de glucosa y que es de 3,6. Esto sugiere que de los tres inhibidores ensayados, sólo el SB203580 consigue reducir, al menos en parte, la autofagia inducida por la glucosa.

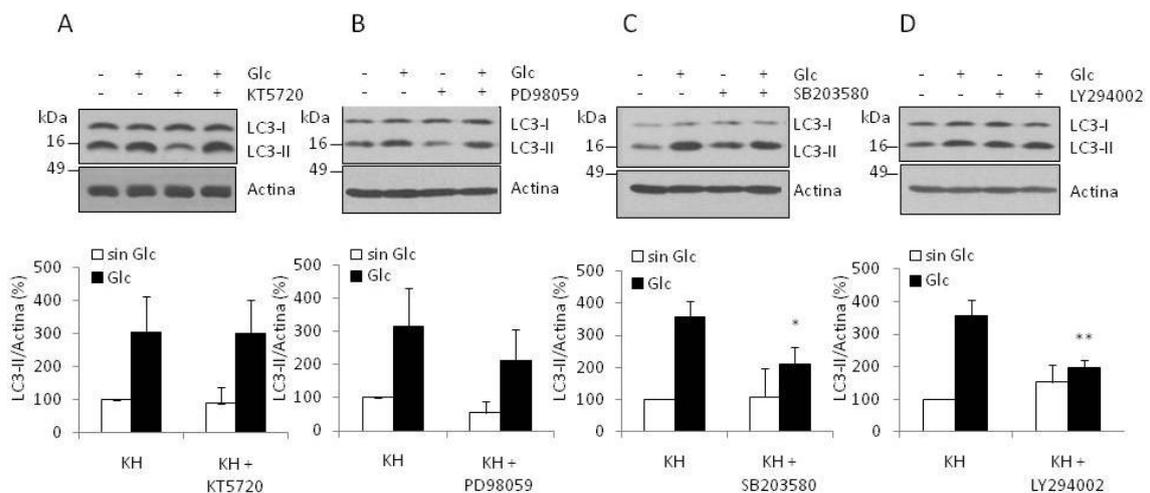


FIGURA 25. Los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa disminuyen al inhibir p38.

Las células NIH/3T3 fueron tratadas con inhibidores de diferentes quinasas (KT5720 25 μ M para la PKA (A); PD98059 20 μ M para ERK1/2 (B); SB203580 20 μ M para p38 (C) y LY294002 50 μ M para PI3K (D)) durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit (KH) sin glucosa. Después, la incubación se prolongó durante 2 h más añadiendo, o no, glucosa (Glc, 10 mM) y NH_4Cl (20 mM) y leupeptina (100 μ M). Las células se lisaron en el tampón RIPA y los extractos se procesaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF donde se detectaron los niveles de la proteína LC3-II y, como control de carga, los de actina. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. En los histogramas se representan las medias y las desviaciones estándar de los niveles de LC3-II relativos a los de actina obtenidas de tres experimentos independientes y se expresan en porcentaje respecto al valor correspondiente al medio de Krebs-Henseleit sin glucosa ni inhibidores. Las diferencias con el valor obtenido en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^* < 0,05$ y $P^{**} < 0,01$.

En resumen, los datos anteriores sugieren que p38 desempeña un papel importante en la vía de señalización que produce la inducción de la autofagia debida a la glucosa.

4.5. PAPEL DE LA QUINASA p38 EN LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA MEDIADA POR GLUCOSA

Aunque se ha descrito ya en la literatura que la MAPK p38 puede regular la autofagia, los efectos producidos son contradictorios y parecen depender en gran medida del tipo celular y del estímulo aplicado (Cuadrado & Nebreda, 2010). Los estímulos que inducen algún tipo de estrés, como un incremento en ROS, activan generalmente a p38 para inducir la autofagia (McClung *et al.*, 2010; Shimada *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2011). Sin embargo, hemos comprobado que la adición de glucosa no implica un aumento de estrés, al menos por ROS. Por ello, en este apartado nos propusimos verificar, de diversas maneras, la posible participación de p38 en la inducción de la autofagia dependiente de glucosa.

4.5.1. p38 ES ACTIVADA EN CONDICIONES DE INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA

Para estudiar la implicación que puede tener p38 en la autofagia, el primer paso es conocer su actividad. Esta viene reflejada de manera efectiva por la fosforilación dual en los residuos Thr180/Tyr182, ya que esta doble fosforilación es necesaria para que la quinasa tenga una actividad catalítica eficaz. Por ejemplo, la fosforilación de p38 únicamente en Thr180 muestra una actividad entre 10 y 20 veces inferior a la encontrada por la doble fosforilación, mientras que p38 permanece inactiva si solamente está fosforilada en la Tyr182. Así pues, la fosforilación en la Thr180, pero no en la Tyr182, es necesaria para la actividad catalítica, aunque esta última fosforilación participa en la auto-activación y en el reconocimiento del sustrato (Askari *et al.*, 2009).

La activación de p38 es producida normalmente por su quinasa MKK (quinasa de MAPK)3/6 y, menos frecuentemente, por MKK4 (que también es una quinasa de JNK) (Cuadrado & Nebreda, 2010). Por otra parte, existen mecanismos por los que p38 puede ser regulada de forma independiente de las MKKs. Por ejemplo, la interacción de la MAPK p38 con TAB-1, permite la regulación de la fosforilación y la localización celular de p38 (Wolf *et al.*, 2011) o la activación de p38 a través de Zap70, que en linfocitos T fosforila a la MAPK p38 en la Tyr323

(Salvador *et al.*, 2005). Existe también la posibilidad que p38 se autofosforile, como ocurre cuando forma un complejo con TAB1 β y TRAF6 (Ge *et al.*, 2002; Ge *et al.*, 2003).

En la FIGURA 26A se muestra el “Western-blot” de la doble fosforilación de la quinasa p38 en los residuos Thr180 y Tyr182 reconocida por el anticuerpo correspondiente. Se observa que esta doble fosforilación es mayor en presencia de glucosa (ver los dos paneles superiores de la izquierda). Puesto que esa fosforilación indica la activación de p38, comprobamos a continuación el estado de fosforilación de sus sustratos.

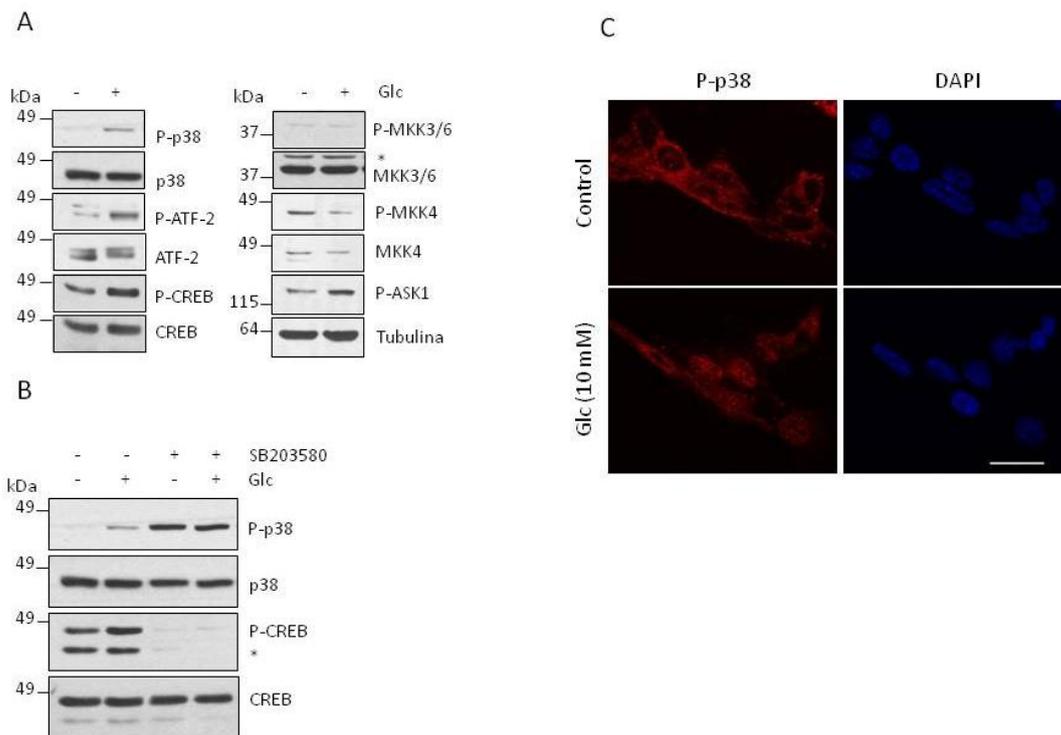


FIGURA 26. La glucosa induce la fosforilación de p38 y su traslocación al núcleo.

Las células se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit carente de glucosa (**A**) y con el inhibidor SB203580 (20 μ M) (**B**). La glucosa (Glc, 10 mM) se añadió, o no, y las células se incubaron durante 2 h más. **A-B**) Las células se recogieron en un tampón de lisis celular con una mezcla de inhibidores de fosfatasa y proteasas, como se indica en Materiales y Métodos. Las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente, se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectaron los niveles de las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de la MAPK p38, de dos de sus proteínas diana, ATF-2 y CREB, y de tres de sus quinasas, MKK3/6, MKK4 y ASK-1, con el uso de anticuerpos específicos. Se muestran imágenes representativas de, al menos, tres experimentos diferentes. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas p38, ATF-2, CREB, MKK3/6, MKK4 y ASK-1, fosforiladas o no. La tubulina se muestra como control de carga para las bandas de fosfo-ASK-1. El asterisco indica una banda inespecífica detectada por el anticuerpo contra fosfo-MKK3/6 en **A**) y una banda que corresponde a fosfo-ATF-1 detectada por el anticuerpo contra fosfo-CREB en **B**). **C**) Las células NIH/3T3 se sembraron en cubreobjetos y se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit con o sin glucosa durante 2 h. Después, las células se fijaron con paraformaldehído 2 %, se lavaron con PBS, se trataron para bloquear los grupos aldehídos, se permeabilizaron y se incubaron durante 16 h con el anticuerpo anti-P-p38. Finalmente, las células se lavaron varias veces, se incubaron con el anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con Alexa-594 durante 1 h y se montaron en los portaobjetos con DAPI para la visualización de los núcleos. En las figuras se muestran imágenes representativas de la fluorescencia de P-p38 en el medio de Krebs-Henseleit con (abajo) y sin (arriba, control) glucosa (Glc). Barra: 20 μ m.

Entre los sustratos de p38 se encuentran el factor de transcripción ATF (factor de activación de la transcripción)-2, la proteína quinasa MSK1/2 que fosforila directamente a factores de transcripción como CREB (elemento de unión de la respuesta al AMP cíclico) y ATF-1 y MK2 (proteína quinasa 2 activada por MAPK) que también fosforila a CREB, entre otros (Cuadrado & Nebreda, 2010). Como se observa en los paneles inferiores (FIGURA 26A), la glucosa indujo la fosforilación de CREB (Ser133) y de ATF-2 (Thr71). Además, comprobamos también que la fosforilación de CREB por glucosa desaparece tras un tratamiento con el inhibidor SB203580 (FIGURA 26B), confirmando que la fosforilación que determina la activación de CREB es dependiente de la actividad de p38 α . En cuanto a las quinasas que fosforilan a p38, como ya se ha dicho, la principal es la MKK3/6 y, después, la MKK4. Por ello investigamos si la glucosa inducía la fosforilación y, por tanto, la activación de ambas. Tal y como se observa en el panel de la derecha de la FIGURA 26A, la glucosa no indujo la fosforilación ni de MKK3/6 ni de MKK4. Sin embargo, encontramos que la quinasa de MKK3/6 y de MKK4/7, ASK-1 (quinasa 1 reguladora de la señal de apoptosis), sí que se fosforila en presencia de glucosa, al igual que p38. ASK-1 es una MAP3K que se activa por fosforilación en su dominio quinasa (Thr845m/Thr838h) principalmente por ROS, TNF α , lipopolisacáridos, estrés del retículo endoplásmico y por la entrada de calcio en la célula (Nagai *et al.*, 2007), pero no existen evidencias de que ASK-1 pueda fosforilar directamente a p38, por lo que posiblemente exista otra proteína intermedia entre ASK-1 y p38 o que ASK-1 active directamente a p38 bajo determinados estímulos como la presencia de glucosa.

Por otra parte, determinados estímulos, sobre todo aquellos que generan un daño en la cadena del ADN (por ejemplo los rayos X o la radiación UV), inducen la fosforilación de p38 con el consiguiente cambio conformacional y produciendo la translocación de la proteína al núcleo (Wood *et al.*, 2009). Esa translocación es importante para que, una vez en el núcleo, p38 pueda fosforilar y activar diversos factores de transcripción y regular así diferentes procesos en respuesta al estrés ambiental (Cuadrado & Nebreda, 2010). Puesto que la glucosa induce la fosforilación de p38, esto debería permitir su transporte al núcleo para controlar diferentes factores de transcripción, como CREB y ATF-2, y otros que pudieran regular la expresión de genes implicados en la autofagia. Para comprobar si la glucosa induce la translocación de p38 fosforilada al núcleo, observamos por microscopia de fluorescencia la localización de la proteína, empleando un anticuerpo específico que reconoce a p38 fosforilada (Thr180/Tyr182), en células incubadas en el medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa. Los núcleos de las células fueron visualizados con el marcaje con DAPI. En las fotografías de la FIGURA 26C se muestra que, en ausencia de glucosa, p38 fosforilada tiene una localización

mayoritariamente citosólica, mientras que en presencia de glucosa esa localización es preferentemente nuclear. Así pues, en resumen podemos decir que la glucosa estimula tanto la fosforilación y la activación de la MAPK p38 como su transporte al núcleo, donde regula la actividad de sus correspondientes dianas, como ATF-2 y CREB.

4.5.2. LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA DEPENDE DE LA ACTIVIDAD DE LA MAPK p38

Anteriormente, en la FIGURA 25C, habíamos observado que la inactivación de p38 con el inhibidor SB203580 reduce los niveles de LC3-II inducidos por la presencia de glucosa. Sin embargo, se ha descrito recientemente que SB203580 y otro inhibidor similar, SB202190, pueden inducir la formación de vacuolas autofágicas de una forma independiente de p38 (Menon *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012). Esta inducción de la autofagia por parte de los inhibidores similares a SB203580 depende, al parecer, de la línea celular utilizada. Así por ejemplo, esos efectos se han observado en células de adenocarcinoma colorectal humano (por ejemplo Caco-2-Bbe o HT29) y en células endoteliales (HUVEC), pero no en células embrionarias de riñón (HEK293T) o en células HeLa y NIH/3T3 (Menon *et al.*, 2011).

Sin embargo y para evitar otros posibles efectos no relacionados con p38, utilizamos otros inhibidores estructuralmente diferentes a SB203580 y sus homólogos. Uno de ellos fue el inhibidor BIRB-796, que se une a p38 a través de su sitio de unión al ATP. Además, utilizamos un inhibidor de una quinasa que es sustrato de p38, la MK2, con el fin de conocer si la regulación de la autofagia por glucosa se refleja en esa vía de señalización corriente abajo de p38. Finalmente, como un criterio independiente para averiguar la posible implicación de p38 en la inducción de la autofagia por la glucosa, utilizamos células NIH/3T3 transfectadas con siRNAs para la MAPK p38 α y MEFs p38^{-/-} y p38^{+/+}, amablemente cedidas por el Dr. Ángel Nebreda (IRB, Barcelona). La FIGURA 27 resume las diferentes estrategias utilizadas en estos estudios.

En la FIGURA 28A puede verse el efecto de diferentes concentraciones de BIRB-796 y del inhibidor de MK2 sobre la fosforilación de p38 (en el primer caso) y de la proteína CREB (en ambos casos) para determinar la concentración más adecuada para la inhibición de esas actividades. Una vez establecidas esas concentraciones (25 nM para BIRB-796 y 5 μ M para el inhibidor de MK2), se llevaron a cabo en esas condiciones los experimentos para determinar el efecto de esos inhibidores sobre la formación de autofagosomas.

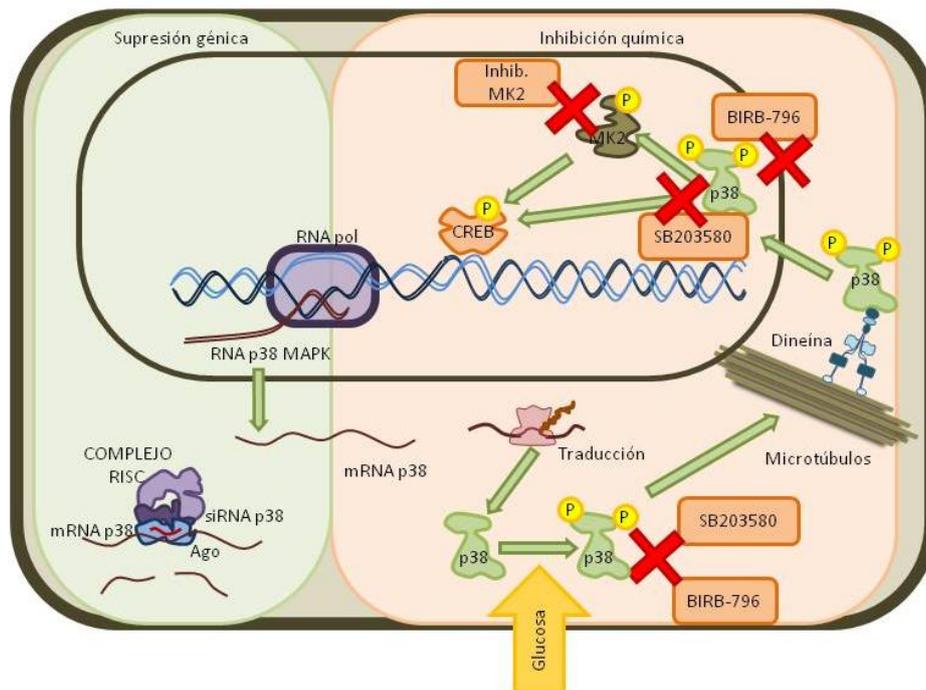


FIGURA 27. Estrategias utilizadas para investigar el papel de p38 en la inducción de la autofagia por glucosa.

La actividad de la quinasa p38 es inducida por la presencia de glucosa, entre otros estímulos, a través de la doble fosforilación en Thr180/Tyr182. Una vez fosforilada, p38 puede dirigirse hacia el núcleo a lo largo de los microtúbulos por dineína. Por otra parte, los inhibidores de p38, SB203580 y BIRB-796, se unen al centro catalítico e impiden que p38 fosforile a sus sustratos en el citosol o en el núcleo. Entre los diferentes sustratos nucleares de p38 está CREB, un factor de transcripción, que también puede ser fosforilado por MK2, otro sustrato directo de p38. Además, la supresión de la síntesis de la MAPK p38 α se realizó por medio de la inserción de unos fragmentos cortos (21-23 nucleótidos) de RNA de doble cadena (siRNA) cuya secuencia es complementaria a la del mRNA de MAPK p38 α . Una vez en el citosol, las moléculas de siRNA se unen al complejo RISC, en el que una de las hebras se separa y se degrada mientras que la otra queda en el complejo RISC. Posteriormente, se une la proteína Ago junto con la cadena complementaria del mRNA de p38 α , que finalmente es degradada por la actividad endonucleasa de Ago. Por otro lado, podemos obtener células que no expresan p38 a través de ratones “knockout”.

La FIGURA 28B muestra diferentes “Western-blot” de LC3-II obtenidos a partir de los extractos de las células NIH/3T3 tratadas con SB203580, BIRB-796 y el inhibidor de MK2, en presencia y en ausencia de glucosa. Abajo se muestra también la cuantificación de las relaciones LC3-II/actina como se hizo en experimentos anteriores. Se observa que tanto la inhibición de p38 con SB203580 o con BIRB-796, como la inhibición de MK2 supusieron una reducción de los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa entre un 40 % y un 50 % con respecto a las muestras control. Por otra parte, en las células NIH/3T3 la supresión de la actividad de p38 en condiciones de ausencia de glucosa no afecta a los niveles de LC3-II cuando se comparan con las correspondientes células en las que p38 es funcional (FIGURA 28B). Esto indica que la

inactivación de p38 reprime exclusivamente los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa sin variar los observados en ausencia de glucosa.

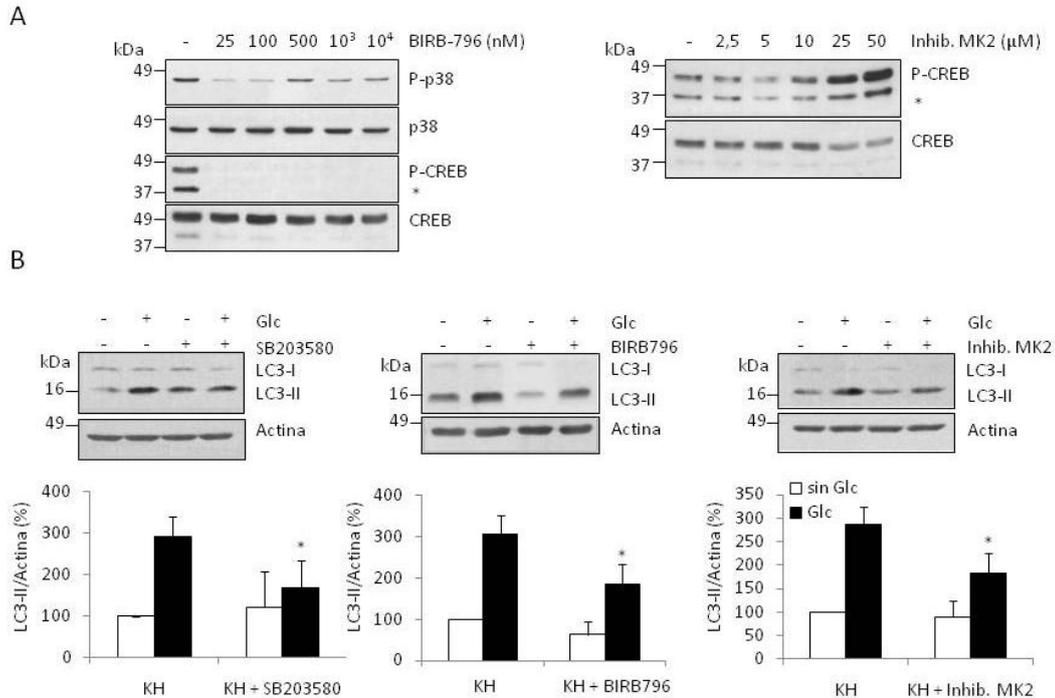


FIGURA 28. La inhibición de p38 α reduce los niveles de LC3-II dependientes de glucosa.

A) Las células NIH/3T3 se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit carente de glucosa junto con diferentes concentraciones del inhibidor de la MAPK p38, BIRB-796, y del inhibidor de la quinasa MK2 (Inhib. MK2). Después de la preincubación, se añadió, o no, la glucosa (Glc, 10 mM), y las células se incubaron durante 2 h más. Posteriormente, las células se recogieron en un tampón de lisis celular con una mezcla de inhibidores de fosfatasa y de proteasas. Las proteínas de las muestras se separaron electroforéticamente, se transfirieron a una membrana de PVDF y se detectaron los niveles con anticuerpos específicos contra las proteínas fosforiladas y no fosforiladas de p38 y de CREB. La figura muestra una imagen representativa de tres experimentos con cada inhibidor. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas p38 y CREB, fosforiladas o no. El asterisco indica una banda inespecífica detectada por el anticuerpo contra fosfo-CREB que corresponde a la ATF-1 fosforilada. **B)** Las células NIH/3T3 se incubaron en el medio de Krebs-Henseleit (KH) sin glucosa durante 30 min, junto con los inhibidores SB203580 (20 μ M), BIRB-796 (50 nM) y el inhibidor de MK2 (5 μ M). La glucosa (Glc, 10 mM) y los inhibidores de las proteasas lisosomales (NH₄Cl 20 mM y leupeptina 100 μ M) fueron añadidos, según se indica, antes de volver a incubar las células durante 2 h más. Seguidamente, se procedió a la recogida de las células con el tampón RIPA para llevar a cabo su lisado. Los extractos celulares se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a unas membranas de PVDF y se detectaron los niveles de LC3 y, como control de carga, de actina por “Western-blot” con anticuerpos específicos. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y actina. Los histogramas situados abajo representan las medias y las desviaciones estándar de la cuantificación de los niveles de LC3-II respecto a la actina de tres experimentos independientes y se expresan en porcentaje respecto a los valores sin glucosa ni inhibidores. Las diferencias con el valor obtenido en ausencia de glucosa fueron significativas con $P^* < 0,05$.

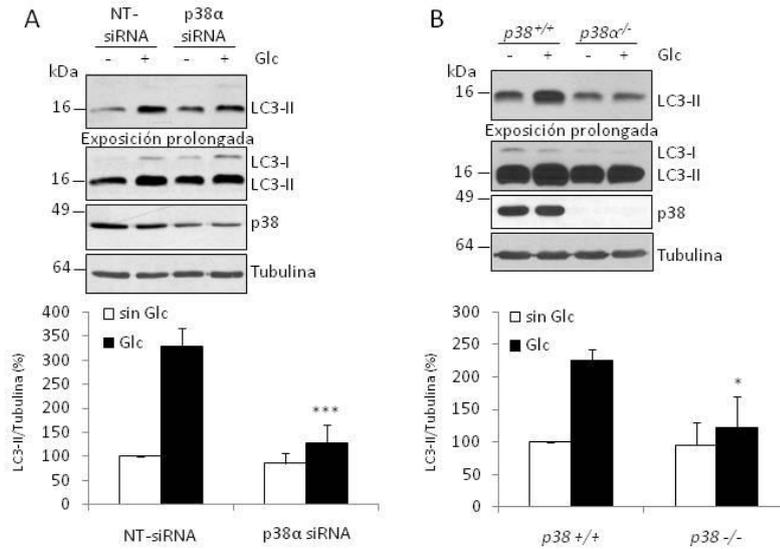


FIGURA 29. La inducción de la autofagia por glucosa es inhibida con siRNAs para p38α y también en los MEFs p38^{-/-}.

En **(A)** las células NIH/3T3 cultivadas en medio DMEM se incubaron durante 24 h con el agente de transfección DharmaFECT1 y los siRNAs para p38 o con NT-siRNA como control (a una concentración de 100 nM en todos los casos). Después, las células fueron tripsinizadas, sembradas e incubadas durante 48 h en el medio de cultivo completo. Transcurrido ese tiempo, las células transfectadas con siRNA p38α o con NT-siRNA **(A)** y los MEFs p38^{-/-} y p38^{+/+} **(B)** se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Después, se añadieron los inhibidores de la proteólisis lisosomal (Ileupeptina 100 μM y NH₄Cl 20 mM) y, donde se indica, la glucosa (Glc, 10 mM) y las células se incubaron durante 2 h más. Las células se recogieron en RIPA y se procesaron como se describe en Materiales y Métodos para detectar los niveles de LC3 y de p38 con el uso de los anticuerpos específicos. Los niveles de tubulina sirvieron como control de carga. Se indican a la izquierda la posición de los marcadores de masa molecular y su tamaño en kDa y a la derecha las bandas correspondientes a las proteínas LC3-I, LC3-II y tubulina. También se muestran dos exposiciones distintas de los “Western-blot” con el anticuerpo de LC3 para visualizar la banda de LC3-I. Los histogramas de abajo representan las medias y las desviaciones estándar de los valores obtenidos de la cuantificación de LC3-II respecto a los de tubulina, calculados a partir de al menos tres experimentos independientes y expresados como porcentaje de los valores control (NT-siRNA y p38^{+/+}) sin glucosa. Las diferencias con los valores control fueron significativas con $P^* < 0,05$ y $P^{***} < 0,005$.

Otros métodos de comprobar el papel de p38 en la inducción de la autofagia por la glucosa consisten en bloquear la expresión de p38 mediante el uso de un siRNA o mediante el uso de MEF p38^{-/-} y p38^{+/+} (FIGURA 27). En las células NIH/3T3 transfectadas con siRNAs para la MAPK p38α e incubadas durante 2 h en un medio de Krebs-Henseleit completo o sin glucosa, los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa se ven reducidos en un 60 % respecto a las células transfectadas con siRNAs no específicos (FIGURA 29A). En el mismo sentido, cuando utilizamos MEF p38^{-/-} y p38^{+/+} que se incubaron en las mismas condiciones que en los experimentos de silenciamiento con siRNA, observamos que en los MEFs p38^{+/+}, tal y como ocurre en las células NIH/3T3, la adición de glucosa incrementó los niveles de LC3-II aproximadamente unas 2,5 veces sobre los niveles de LC3-II de las células privadas de glucosa (FIGURA 29B). En cambio, en

los MEFs $p38^{-/-}$ no se produjo ese efecto de la glucosa y los niveles de LC3-II de las células tratadas con glucosa se mantuvieron similares a los encontrados en las células que no dispusieron del azúcar (un descenso del 50 % respecto a los MEFs $p38^{+/+}$ en presencia de glucosa).

Por tanto, estos datos en su conjunto apoyan que la autofagia inducida por la glucosa está regulada de forma importante por la actividad de p38, ya que su inhibición reduce los niveles de LC3-II, por tanto la formación de autofagosomas, incrementados por el tratamiento con glucosa.

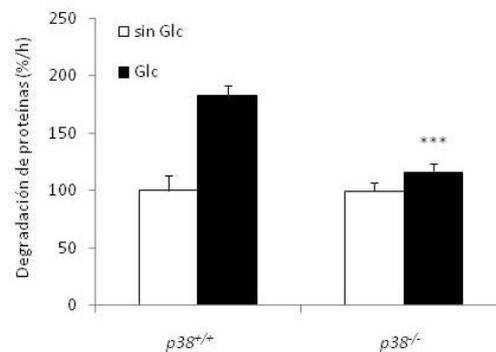


FIGURA 30. La degradación de proteínas inducida por la glucosa es reprimida en las células $p38^{-/-}$.

Las células MEF $p38^{-/-}$ y $p38^{+/+}$ se incubaron en DMEM suplementado con suero bovino fetal. Las células se incubaron en presencia de L-[3 H]-valina durante 24 h y, tras los lavados con PBS, se mantuvieron durante las siguientes 24 h en un medio DMEM con suero bovino fetal y al que se le añadió L-valina 10 mM para reducir la reutilización del aminoácido radioactivo. Después, los MEFs se incubaron durante 30 min en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa, se añadió la glucosa (Glc, 10 mM) en los casos indicados y se incubaron 2 h más. A diferentes tiempos durante 4 h, se tomaron muestras del medio, se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético, se midió la radioactividad presente en el sobrenadante con un contador de centelleo líquido y, tras medir la radioactividad insoluble en ácido tricloroacético que quedaba en las células de la misma manera, se determinó la degradación de proteínas como se describe en Materiales y Métodos. El histograma representa las medias y las desviaciones estándar del porcentaje de la proteína degradada obtenida de cada una de las cuatro medidas independientes realizadas y se expresan como porcentaje de los valores control ($p38^{+/+}$ sin glucosa ($1,86 \pm 0,26$ %/h)). Las diferencias con los valores control fueron significativas con $P^{***} < 0,005$.

Hasta el momento hemos visto el papel de p38 sobre la autofagia analizando los niveles de LC3-II. Estos, a pesar de ser indicativos de los niveles de los autofagosomas, no proporcionan una medida directa de la proteína degradada. Por ello, realizamos experimentos de “pulso-azúcar” con los MEFs $p38^{+/+}$ y $p38^{-/-}$. En esos experimentos comprobamos que en los MEFs $p38^{-/-}$ la degradación de las proteínas marcadas con 3 H-valina desciende aproximadamente un 40 %

respecto a la que ocurre en las células $p38^{+/+}$ en presencia de la glucosa (FIGURA 30). En esos mismos experimentos también observamos que en MEF $p38^{-/-}$ no se produce un aumento en la cantidad de proteína degradada en ausencia de glucosa.

Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos con diferentes procedimientos, concluimos que la glucosa induce la formación de autofagosomas y estimula la degradación de proteínas a través de la MAPK p38.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Como se ha mencionado varias veces anteriormente, la degradación intracelular de proteínas ocurre mediante dos mecanismos principales: la autofagia y el sistema ubiquitina-proteasomas (Knecht *et al.*, 2009). Esta degradación tiene lugar en las células con el objetivo final de mantener la homeostasis celular y se caracteriza, entre otras cosas, porque está altamente regulada por diferentes vías de señalización que se modulan en respuesta a distintos estímulos y que frecuentemente están interconectadas. La comprensión de cómo funciona esta regulación tiene gran importancia, especialmente porque se ha comprobado que una degradación anómala de proteínas está asociada a diferentes patologías, como ocurre entre otras en algunas enfermedades neurodegenerativas (Parkinson (Ebrahimi-Fakhari *et al.*, 2012), Alzheimer (Ihara *et al.*, 2012) o Huntington (Godin *et al.*, 2010), miodegenerativas (Danon), cardíacas (Pompe) y en varios tipos de cáncer (Levine & Kroemer, 2008).

Una de las formas más comunes de regulación de la degradación intracelular de proteínas depende de la disponibilidad de nutrientes. En este trabajo hemos estudiado la regulación de la proteólisis intracelular dependiente de la glucosa y hemos abordado ese estudio a través de dos aspectos principales. En primer lugar, y puesto que los datos disponibles eran controvertidos, hemos analizado detalladamente y empleado diversos métodos el efecto de la glucosa sobre los principales mecanismos de degradación intracelular de proteínas, especialmente en lo que se refiere a la autofagia. En segundo lugar, hemos estudiado el mecanismo por el que la glucosa regula la autofagia, ya que este es el principal mecanismo que se ve afectado por la disponibilidad de nutrientes.

5.1. REGULACIÓN DE LA PROTEÓLISIS INTRACELULAR POR GLUCOSA

El efecto de la glucosa sobre la degradación intracelular de proteínas ha sido muy estudiado en levaduras donde, aunque existen datos discrepantes sobre todo en aquellas publicaciones más recientes, parecía estar bastante aceptado que la glucosa inducía la autofagia. Sin embargo en mamíferos, aunque existe también alguna controversia y el número de estudios es más reducido y reciente, ocurría lo contrario y se consideraba por la mayoría de autores que la glucosa, como nutriente que es, inhibía la autofagia. Conviene anotar aquí que los datos disponibles en cuanto a la regulación de la degradación intracelular de proteínas por la glucosa

se refieren casi exclusivamente a la autofagia, ya que solo recientemente se ha considerado en algunos estudios que la actividad del sistema ubiquitina-proteasomas puede estar regulada también por nutrientes pero, desde luego, a una escala mucho menor que la autofagia (ver por ejemplo Fuertes *et al.* (2003)). En este estudio hemos intentado aportar los datos necesarios para aclarar esta controversia acerca del efecto de la glucosa sobre la autofagia analizando la función de la glucosa sobre la proteólisis intracelular en general y sobre la autofagia en particular en células de mamífero.

5.1.1. LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA AUTOFÁGICA

La autofagia es un proceso complejo y muy dinámico que ha planteado numerosos problemas cuando se ha tratado de cuantificarlo. De hecho, durante mucho tiempo la única forma fiable de evaluar el nivel de autofagia en las células fue la microscopia electrónica, un procedimiento que muestra sin embargo una imagen estática de las vacuolas autofágicas (Knecht *et al.*, 1984; Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.* 2012). Más recientemente se han desarrollado otros numerosos procedimientos para estudiar la autofagia, pero la conclusión a la que se ha llegado en este momento es que no existe ninguno que sea absolutamente adecuado para esa cuantificación, por lo que la recomendación general para alcanzar interpretaciones fiables es usar varios de esos procedimientos a la vez (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). Por eso, en cualquier estudio sobre la autofagia es importante el empleo de diferentes técnicas para poder concluir que un tratamiento específico tiene un efecto determinado. Esto se debe a que la autofagia es un proceso altamente dinámico y con varias fases, que esencialmente incluyen la formación de la membrana pre-autofagosomal, su nucleación para formar el autofagosoma, la fusión del autofagosoma con los endosomas y lisosomas para formar el autolisosoma y la degradación de su contenido (Knecht *et al.*, 2009). Cada una de estas fases puede estar regulada de manera distinta. De hecho, el empleo de una sola técnica podría dar lugar a interpretaciones erróneas en el proceso global de la autofagia, un concepto dinámico que se conoce actualmente como flujo autofágico (“autophagic flux”, (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012)). Este es el caso, por ejemplo, de un trabajo en el que se cultivaron cardiomiocitos en un medio libre de glucosa durante 12 h y que concluía que la privación de glucosa induce la autofagia en base al análisis de los niveles del marcador específico de autofagosomas LC3-II (Jiao *et al.*, 2013). Sin embargo, los autores solo mostraban el dato de las medidas realizadas en ausencia de inhibidores lisosomales, sin tener en cuenta que la proteína LC3-II se degrada en los lisosomas cuando avanza el flujo autofágico (ver más adelante). Por

eso, los resultados obtenidos no descartan que el aumento que observan en esas condiciones pueda ser debido precisamente a lo contrario, es decir, a un defecto en la autofagia en la fase de fusión de los autofagosomas con los endosomas y lisosomas. Lo mismo ocurre cuando simplemente se han analizado los niveles de vacuolas autofágicas totales por microscopia electrónica y sin separar las Avi (o vacuolas autofágicas iniciales, equivalentes aproximadamente a los autofagosomas) de las Avd (o vacuolas autofágicas degradativas o tardías, equivalentes aproximadamente a los autolisosomas): un aumento de las Avd sin que aumenten concomitantemente las Avi puede no indicar una mayor autofagia, sino una detención del flujo autofágico. Pero además ni siquiera los niveles de LC3-II en presencia de inhibidores lisosomales son totalmente fiables ya que en determinadas situaciones se ha visto que la proteína LC3-II se une a estructuras diferentes a los autofagosomas (Kuma *et al.*, 2007).

Por esos motivos, para estudiar el efecto de la glucosa sobre la autofagia hemos analizado en este trabajo, además del número y el volumen fraccional de los diferentes tipos de vacuolas autofágicas por microscopia electrónica, los niveles de LC3-II en presencia o en ausencia de inhibidores lisosomales, la masa lisosomal y el porcentaje de degradación intracelular de proteínas totales y debidas a autofagia (macroautofagia) en experimentos de pulso y caza, utilizando en todos los casos técnicas bien establecidas y aceptadas (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). En cuanto a la microscopia electrónica, nuestros resultados muestran que la glucosa produce un aumento de dos veces en el número de ambos tipos de estructuras autofágicas (Avi y Avd), sin que el tamaño de estas vacuolas varíe. Esto sugiere que la glucosa incrementa la formación de vacuolas autofágicas y hace poco probable, aunque no lo excluye totalmente, que ese aumento se deba a un defecto de fusión entre autofagosomas y lisosomas o endosomas, ya que en este último caso se produciría un incremento en el volumen fraccional de las Avd mucho mayor que en el caso de las Avi. Además, mediante la cuantificación de la fluorescencia del fluoróforo LysoTracker Red, que se acumula en las estructuras ácidas (lisosomas y autolisosomas, entre otros compartimientos), observamos que esta es aproximadamente dos veces mayor en presencia de glucosa, lo que indica también que el flujo autofágico transcurre con normalidad a través de las diferentes etapas. Estos experimentos se realizaron en ausencia de inhibidores lisosomales, ya que afectan a la función de los lisosomas, como la leupeptina que inhibe las principales proteasas lisosomales y el NH_4Cl que sube el pH de estos orgánulos (recordemos que la actividad óptima de las proteasas lisosomales requiere un pH ácido (Knecht *et al.*, 2009; de Duve, 1983)). En los experimentos de microscopia electrónica, el uso de estos inhibidores hubiese incrementado el volumen fraccional de las vacuolas autofágicas más maduras (es decir, del tipo Avd), al no producirse la degradación del

material secuestrado por la membrana autofagosomal, mientras que el aumento de pH habría reducido muy sensiblemente la señal del LysoTracker Red en los lisosomas y en otros compartimentos con pH ácido intralumenal. Por eso, estos inhibidores se utilizaron solo en los análisis por “Western-blot” de los niveles de la proteína LC3-II como veremos a continuación y no en los demás procedimientos utilizados para evaluar la autofagia.

La cuantificación de la proteína LC3, en su forma lipídica llamada LC3-II, es la técnica más ampliamente utilizada para el estudio de la autofagia e informa sobre la formación de autofagosomas, ya que LC3-II es prácticamente la única proteína cuya localización es específica de las membranas del autofosoma (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). Sin embargo, para la cuantificación de LC3-II es necesaria la siguiente consideración. Después de la fusión del autofosoma con los lisosomas, la proteína LC3-II asociada a la membrana interna del autofosoma es susceptible de ser digerida por las hidrolasas lisosomales. Así que la estimación precisa de la formación de autofosomas durante un tiempo determinado requiere la inhibición lisosomal para evitar la degradación de LC3-II (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012). Nuestros resultados muestran, en ausencia de inhibidores lisosomales, un ligero incremento de los niveles de LC3-II en presencia de glucosa respecto a la privación del azúcar. En las mismas condiciones, pero tratando las células con bafilomicina A₁ o con leupeptina y NH₄Cl, observamos en ambos casos que la glucosa induce una acumulación de prácticamente dos veces de los niveles de LC3-II y, por tanto, un aumento de la formación de autofosomas. Aunque observamos que la glucosa produce en presencia de inhibidores lisosomales una acumulación de LC3-II y en ausencia de esos inhibidores un aumento también de dos veces en el número y volumen fraccional de Avd (además de un aumento similar de esos mismos parámetros para Avi) y de la señal de LysoTracker Red, quisimos comprobar que ese incremento en los autolisosomas en particular (Avd) y en los lisosomas en general (LysoTracker Red) se correspondía realmente con un aumento en la degradación intracelular de proteínas. Es decir, tratamos de ver si una vez formados los autolisosomas las proteínas encerradas dentro de ellos eran degradadas por las catepsinas lisosomales. En los experimentos de pulso y caza, parece claro que el porcentaje de proteólisis total se duplica también en presencia de glucosa y que la proteína degradada a través de la autofagia aumenta en una proporción similar. Sin embargo, el hecho de que la degradación intracelular de proteínas por autofagia corresponda solo a un 40 % de la proteólisis total y que el aumento observado no de cuenta de todo el aumento en la proteólisis total indica que no solo la autofagia es inducida por la glucosa, sino que otros mecanismos de degradación intracelular de proteínas, por ejemplo el sistema ubiquitina-proteasomas, también son estimulados como

discutiremos en el siguiente punto (ver apartado 5.1.2. de esta Discusión, “La glucosa induce la vía ubiquitina-proteasomas”).

Nuestros resultados se ven apoyados por algunos de los resultados obtenidos en otros trabajos. En primer lugar, se ha observado que la glucosa promueve el ensamblaje de los dominios V_1 y V_0 de la V-ATPasa, así como su estabilización en las membranas de compartimentos intracelulares como los lisosomas, lo que permite que estos orgánulos tengan un pH luminal ácido y que las hidrolasas lisosomales sean más activas (Sautin *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha demostrado que la glucosa promueve la eliminación de los agregados de la proteína huntingtina mutada que se acumulan en la enfermedad de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2003). Esto se observó tanto al sobreexpresar el transportador de glucosa GLUT1 como tratando las células con concentraciones crecientes de glucosa. La eliminación de dichos agregados se debe al parecer a un aumento de la autofagia producido a través de la inhibición de la vía Akt/mTORC1 (Ravikumar *et al.*, 2003). Este efecto sobre los agregados de huntingtina también se ha observado al tratar las células con trehalosa, ya que este disacárido de glucosa también induce la autofagia (Sarkar *et al.*, 2007; Casarejos *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de que nuestros resultados y los resultados mencionados arriba muestran con claridad que la glucosa estimula la autofagia, existen varios trabajos que concluyen que la glucosa inhibe la autofagia. En ellos observamos que una de las diferencias principales respecto a la metodología de nuestro trabajo es la incubación de las células en un medio de crecimiento como el DMEM. Por ejemplo, Maruyama *et al.* (2008) incubaron cardiomiocitos en medio DMEM suplementado con glucosa (11 mM) o con manitol (11 mM) para mantener la misma osmolaridad en los dos medios. Al cabo de cuatro días observaron que en el medio sin glucosa aumentaban los niveles de LC3-II y el número de las estructuras autofágicas. Hariharan *et al.* (2010) también incubaron cardiomiocitos en el medio DMEM, con o sin glucosa y, tras dos días, comprobaron que la privación de glucosa aumentaba el número de células con agregados de GFP-LC3, un hecho indicativo de un aumento en el número de vacuolas autofágicas. También comprobaron que se producía un descenso en los niveles de la proteína p62, descenso que normalmente está asociado a un incremento de la autofagia. A diferencia de los trabajos expuestos y de otros similares, nuestros experimentos se han realizado utilizando un medio carente de nutrientes, como es el medio de Krebs-Henseleit, en el que las células no disponen de ningún otro regulador nutricional. En estas condiciones, la adición de glucosa estimula la formación de más autofagosomas y, finalmente, la degradación intracelular de proteínas por autofagia, lo que demuestra que, en ausencia de otros factores, la glucosa induce la autofagia.

Para descartar si las diferencias podían deberse al medio de incubación, realizamos los mismos experimentos incubando las células en el medio DMEM en vez de en el medio de Krebs-Henseleit. Curiosamente, la incubación en el medio DMEM aumenta los niveles de LC3-II en las células en comparación con esos niveles en aquellas que se han incubado en el medio de Krebs-Henseleit, lo que puede deberse a que el medio DMEM contiene glutamina que se ha descrito que tiene un papel como inductor de la autofagia basal (Sakiyama *et al.*, 2009). Sin embargo, cuando analizamos el efecto de la glucosa observamos que en el medio DMEM se induce también la autofagia como ocurría en el medio de Krebs-Henseleit. Por tanto, hemos confirmado la inducción de la autofagia por la glucosa mediante procedimientos diferentes, incluyendo la cuantificación de la degradación intracelular de proteínas por esa vía, y todos ellos apoyan la conclusión de que la glucosa induce la autofagia, independientemente además de que se emplee el medio de Krebs-Henseleit o el medio DMEM.

Otra posibilidad que podría explicar el que los experimentos realizados con el medio DMEM en otros laboratorios como los citados más arriba mostraran que la glucosa inhibe la autofagia sería por causa de otra diferencia importante respecto a nuestro trabajo: el tiempo de incubación. La privación de glucosa durante 2 h o durante 2-4 días debe tener desde luego consecuencias diferentes para la regulación de la autofagia. Los estudios sobre la autofagia durante incubaciones prolongadas requieren el uso de medios como el DMEM (por ejemplo (Jiao *et al.*, 2013)), ya que el tratamiento de células en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa aumenta la muerte celular al cabo de 12 h. Una consecuencia inmediata a la privación de glucosa en el medio es la disminución en los niveles de ATP, cuya importancia en la autofagia comentaremos más adelante en esta Discusión (ver apartado 5.2., “La inducción de la autofagia por glucosa requiere en parte el ATP producido a partir de su metabolismo”). En ese sentido, existe la paradoja de que la autofagia, a la vez, precisa ATP y lo produce. Así, consideramos que las células privadas de glucosa, tanto en medio DMEM como en medio de Krebs-Henseleit durante las dos primeras horas pueden responder inhibiendo la autofagia, que requiere ATP, como una medida inmediata de ahorro energético. En cambio, creemos que después de 12-48 h de privación de glucosa en el medio DMEM, como se da en otros estudios, los niveles de ATP deben ser insuficientes para mantener importantes funciones necesarias para la supervivencia de las células, aunque no para impedir la autofagia. En esas condiciones, la célula estimularía la autofagia no solo para eliminar los componentes innecesarios o dañados, sino sobre todo para obtener energía del catabolismo de los productos degradados.

Otra diferencia existente en nuestro trabajo en comparación con otros radica en el tipo celular utilizado en estos experimentos, que en nuestro caso eran las células NIH/3T3. Por ello,

utilizamos otros tipos celulares, tanto de origen murino como humano, y llevamos a cabo los mismos tratamientos. Observamos así que las células MEF, HeLa y HEK293T, al igual que las NIH/3T3, incrementaron los niveles de LC3-II al añadir glucosa al medio de Krebs-Henseleit. Estas líneas celulares se incubaron también en un medio más completo que el medio de Krebs-Henseleit como el medio DMEM y los resultados indicaron, una vez más, que la glucosa induce la autofagia.

Es bien sabido, desde los albores de los trabajos con cultivos celulares, que el suero, por ejemplo el suero bovino fetal o FBS, favorece notablemente el crecimiento de las células animales. Por ello, estudiamos también el efecto de la glucosa sobre la autofagia en el medio DMEM suplementado ahora con FBS. Así comprobamos que la presencia de FBS en el medio de Krebs-Henseleit minimiza el efecto estimulador de la glucosa sobre la autofagia y que este efecto era aún mayor cuando utilizamos DMEM y FBS, ya que en esas condiciones no se observa un aumento significativo de la autofagia en presencia de glucosa, aunque la adición de este azúcar en ese medio sigue mostrando una tendencia a aumentar la autofagia. De hecho, se sabe que el suero es un potente inhibidor de la autofagia y que la falta de suero induce la degradación intracelular de proteínas en células cultivadas a través de un aumento de la autofagia (un ejemplo de eso lo encontramos por ejemplo en Xavier *et al.* 2010). Debido a que el suero aporta diferentes compuestos y nutrientes para el mantenimiento del metabolismo y del nivel energético de la célula, la autofagia inducida por la privación del suero permite que el metabolismo y el estado energético sigan manteniéndose estables (Lee *et al.*, 2012b). Entre los componentes del suero podemos encontrar factores de crecimiento, hormonas, aminoácidos, carbohidratos y vitaminas y cada uno podría afectar a la autofagia por un mecanismo y una vía de señalización diferente. Sin embargo, es difícil identificar el principal componente que es responsable de ese efecto sobre la autofagia y se supone que es un conjunto de diferentes componentes del suero lo que daría como resultado el efecto final de este sobre la autofagia. Por ejemplo, se ha demostrado que los factores de crecimiento IGF y EGF inhiben la autofagia a través de la activación de mTORC1, de forma que la estimulación de la autofagia que se observa durante la privación de suero se inhibe en parte al añadir IGF y EGF (Sobolewska *et al.*, 2009). Otro componente del FBS que también inhibe la autofagia es la insulina, que emplea para ello la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 (Chan *et al.*, 2012). La concentración de los reguladores de la autofagia tiene un papel muy importante sobre la potencia de su efecto y este puede variar dependiendo del lote de suero utilizado como hemos comprobado en varias ocasiones. Así, la concentración de insulina que encontramos en un medio con 10 % de suero puede llegar hasta los 2 nM (Freshney, 2010:110). En Esteban *et al.* (2007) se describe que la

presencia de una concentración de insulina de 100 nM supone ya una reducción significativa (30 %) de la degradación intracelular de proteínas totales y que una concentración diez veces menor (10 nM) aún reduce esa degradación en un 20 %. Así, el efecto de la insulina junto con el de otros componentes del suero, como los factores de crecimiento e incluso los aminoácidos, pueden contribuir conjuntamente a la inhibición de la autofagia.

Los aminoácidos son potentes reguladores negativos de la autofagia (Esteban *et al.*, 2007; Kadowaki *et al.*, 2006) y aunque siguen muy diversas vías de señalización hasta la autofagia, una de ellas transcurre a través de la activación de la vía PI3K/mTORC1 (McAlpine *et al.*, 2013). En el suero, la concentración de los aminoácidos es de alrededor de 1 μ M y en un medio completo, como el medio DMEM, la mayoría de los aminoácidos presentes están a una concentración entre 0,2 y 0,8 mM. De hecho, Esteban *et al.* (2007) indica que la adición de una mezcla de aminoácidos esenciales a una concentración entre 0,2-0,5 mM de cada aminoácido inhibe la proteólisis intracelular en un 30 %. Por último, el suero puede contener una concentración de glucosa que varía entre 0,3 y 0,6 mM, una concentración que puede también contribuir a enmascarar el estímulo de la glucosa sobre la autofagia en presencia de suero.

En resumen, el tipo de medio, el tiempo de incubación y la presencia de suero y aminoácidos durante la incubación pueden tener diferentes consecuencias sobre la regulación de la autofagia por glucosa, aunque en todas las condiciones que hemos comentado se observa un efecto activador sobre la autofagia y, en ningún caso, una inhibición. De hecho, en un estudio muy reciente (Naito *et al.*, 2013) en el que se investigan los posibles efectos diferenciales de tres supuestos supresores de la autofagia (la insulina, los aminoácidos y la glucosa) sobre tejidos diferentes (hígado y músculo, concretamente), se concluye con cierta sorpresa que la glucosa no tiene ningún efecto supresor sobre la autofagia. Es cierto que tampoco se describe un efecto activador de la glucosa, pero este puede apreciarse en alguna de las figuras. Además, este efecto, que es precisamente el opuesto al que los autores del estudio esperaban, puede haber pasado desapercibido por las condiciones en que se han realizado los experimentos y que, como hemos comentado arriba, pueden enmascarar el efecto activador de la glucosa sobre la autofagia.

5.1.2. LA GLUCOSA INDUCE LA VÍA UBICUITINA-PROTEASOMAS

Al analizar mediante experimentos de pulso y caza el aumento de la degradación intracelular de proteínas producido por la glucosa observamos que no toda la proteólisis podía explicarse

por el aumento de la autofagia y que debían de existir otros mecanismos de degradación intracelular de proteínas que contribuyesen al incremento observado. De los diferentes procesos proteolíticos celulares que se han descrito, el sistema ubiquitina-proteasomas es, junto a la autofagia, el más importante de ellos (Knecht *et al.*, 2009). En esta vía, las proteínas que se degradan por los proteasomas son previamente modificadas con cadenas de poliubiquitina. Por lo tanto, nos planteamos estudiar el efecto de la glucosa sobre el sistema ubiquitina-proteasomas y para ello analizamos sus dos pasos principales, la poliubiquitinación de las proteínas y la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas, que es su principal actividad catalítica.

Para poder analizar el grado de poliubiquitinación de las proteínas independientemente de su proteólisis utilizamos un inhibidor de la actividad de los proteasomas, el MG132, que permite así la acumulación de las proteínas que son sustrato de los proteasomas, sobre todo poliubiquitinadas, al impedir su degradación. En estas condiciones observamos una mayor acumulación de proteínas poliubiquitinadas en presencia de glucosa. Sin embargo, es conveniente destacar que se ha descrito que varios inhibidores de los proteasomas, como el Bortezomib y el NPI-0052, inducen la expresión de las proteínas Atg5 y Atg7 y provocan el aumento en un 30-40 % de los niveles de LC3-II y, por tanto, de la formación de los autofagosomas (Zhu *et al.*, 2010). Esta autofagia inducida podría degradar, al menos en parte, las proteínas poliubiquitinadas acumuladas en ausencia de una actividad proteasomal. Aunque se desconoce el mecanismo molecular preciso de esa inducción de la autofagia, en el caso del Bortezomib parece que ocurre de forma independiente de la inhibición de los proteasomas y mediante un descenso de la fosforilación de Akt que repercute en una menor activación de mTORC1 (Yu *et al.*, 2013). También se ha descrito que el inhibidor proteasomal MG132, que es el que nosotros hemos empleado en nuestros estudios, aumenta la expresión de la proteína LC3-II y con ello la inducción de la autofagia (Wu *et al.*, 2008). Sin embargo, más recientemente se ha descartado que el MG132, y también otro conocido inhibidor proteasomal, la lactacistina, induzcan la autofagia de forma significativa (Yu *et al.*, 2013). En cualquier caso, nuestros resultados muestran que la poliubiquitinación de proteínas es mayor en presencia de glucosa, por lo que en el hipotético caso de que parte de la proteína poliubiquitinada se estuviera degradando por la autofagia inducida por glucosa, la diferencia observada con la condición de ausencia de glucosa sería aún mayor que la que hemos puesto de manifiesto aquí. Es decir que en cualquier caso podemos concluir que la adición de glucosa al medio de cultivo incrementa la poliubiquitinación de las proteínas. Finalmente, además del aumento en la poliubiquitinación de proteínas, el análisis de la degradación del sustrato Suc-LLVY-MCA por

los proteasomas reveló que la glucosa aumenta también la actividad análoga a quimotripsina de los proteasomas en un 20 % y, como ya se ha indicado en la Introducción, esta actividad es la más importante de las tres actividades proteolíticas de los proteasomas para la degradación intracelular de proteínas (Kisselev *et al.*, 2005).

La privación de glucosa tiene varias consecuencias y al menos tres de ellas podrían afectar a la degradación intracelular de proteínas por los proteasomas. En primer lugar, esa privación induce un estrés oxidativo, lo que frecuentemente conduce a la formación de unos agregados de proteínas mal plegadas llamados agresomas (Marambio *et al.*, 2010). Los proteasomas juegan un importante papel en la eliminación de estos agresomas que tienden a acumularse en la célula cuando se inhiben los proteasomas, por ejemplo con Bortezomib (David *et al.*, 2010). Estos agresomas incluso pueden llegar a inhibir a los proteasomas que se dirigen a degradarlos al quedar atrapados en la red de proteínas así formada. Si el efecto sobre el estrés oxidativo fuese el único responsable de los cambios en el sistema ubiquitina-proteasomas, la consecuencia de la adición de glucosa sería un aumento de la actividad proteolítica de los proteasomas que conllevaría también una disminución en los niveles de proteínas poliubiquitinadas. Como hemos visto en la sección de Resultados, esto es algo que no ocurre en nuestros experimentos. Una segunda consecuencia de la privación de glucosa que pudiera ser relevante para la degradación intracelular de proteínas por los proteasomas se refiere a la pérdida de la homeostasis de los iones calcio y sodio, que es necesaria para el correcto funcionamiento de la vía ubiquitina-proteasomas. Por ejemplo, la privación de glucosa y del oxígeno durante una isquemia implica una entrada masiva de calcio y sodio a las células neuronales. Por un lado, la acumulación de calcio lleva hacia la disfunción del retículo endoplásmico y al mal plegamiento de las proteínas formando agregados. Por otro lado, las células responden expulsando el sodio excedente a través de los transportadores Na^+/K^+ ATPasa que requieren ATP, consumiéndolo y reduciendo su disponibilidad para el funcionamiento de los proteasomas (Chen *et al.*, 2010). De esta forma, y como consecuencia, se produce una disminución de los niveles energéticos de la célula, lo que debe afectar a la actividad catalítica de los proteasomas ya que es bien sabido desde su descubrimiento inicial que el sistema ubiquitina-proteasomas es dependiente de ATP (Hoglinger *et al.*, 2003) y, de hecho, esa fue la propiedad que se destacó sobre otras vías proteolíticas cuando comenzaba a caracterizarse el sistema ubiquitina-proteasomas (probablemente porque entonces se pensaba que la degradación lisosomal no requería ATP). La dependencia de ATP de este sistema comienza ya en la poliubiquitinación, ya que la activación inicial de la molécula de ubiquitina por la enzima E1 consume ATP (Hershko *et al.*, 1984). Después, ya en los proteasomas el ATP

es necesario para la actividad de las ATPasas Rpt1-6 del complejo regulador 19S que despliegan el polipéptido previamente desubicitinado y facilitan su entrada al interior del proteasoma donde los enlaces peptídicos son hidrolizados (Sledz *et al.*, 2013; Lecker *et al.*, 2006). Por tanto, y excluyendo el estrés oxidativo, el aumento de los niveles de ATP y probablemente también el mantenimiento de la homeostasis de los iones calcio y sodio, producidos ambos por el aumento de glucosa podrían explicar el incremento observado tanto en la poliubiquitinación de proteínas como en la actividad análoga a la quimotripsina de los proteasomas y, en definitiva, el incremento de la degradación intracelular de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasomas.

Existen varios ejemplos en la literatura que describen que la glucosa estimula la degradación intracelular de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasomas, tanto en levaduras como en células de mamíferos. Sin embargo, esos ejemplos se refieren a proteínas específicas y no al conjunto de la degradación intracelular de proteínas por el sistema ubiquitina-proteasomas. Por ejemplo, durante la privación de glucosa se induce la expresión de la enzima fructosa-1,6-bisfosfatasa implicada en la gluconeogénesis. En cambio, cuando las levaduras pasan a un medio con glucosa, la fructosa-1,6-bisfosfatasa parece que es poliubiquitinada y degradada por los proteasomas (Schork *et al.*, 1994; Horak *et al.*, 2002), si bien ha existido alguna polémica acerca de la vía responsable de esa degradación (Regelmann *et al.*, 2003). También en mamíferos encontramos ejemplos en los que la glucosa induce la poliubiquitinación y posterior degradación de determinados sustratos, como CREB y Cx43 (Fernandes *et al.*, 2004; Costes *et al.*, 2009).

En resumen, a partir de los resultados comentados hasta el momento concluimos que la glucosa estimula la degradación intracelular de proteínas a través de la autofagia, pero también del sistema ubiquitina-proteasomas. Esto una vez más apoya la existencia de una estrecha cooperación entre las principales vías de degradación intracelular de proteínas. Debido a que el tema principal de este trabajo es el estudio de la regulación de la autofagia por la glucosa, a partir de aquí nos hemos centrado en este mecanismo proteolítico y en las vías de señalización por las que la glucosa induce su actividad. En cuanto al incremento de la actividad del sistema ubiquitina-proteasomas por la glucosa, aunque no lo hemos estudiado aquí, es probable que la quinasa AMPK puede ser una de las principales proteínas que regule esa vía, ya que durante la privación de glucosa se activa la quinasa AMPK, como también hemos observado en nuestros resultados, y se ha descrito que esto conduce a una inhibición del proteasoma 26S (Xu *et al.*, 2012).

5.2. LA INDUCCIÓN DE LA AUTOFAGIA POR GLUCOSA REQUIERE EN PARTE EL ATP PRODUCIDO A PARTIR DE SU METABOLISMO

Una vez establecido claramente por diversos procedimientos que la glucosa tiene un efecto inductor sobre la autofagia, pasamos a estudiar algunos detalles acerca del mecanismo por el que se producía esto. Nos planteamos, en primer lugar, que la autofagia inducida por glucosa pudiera deberse a un aumento de los niveles de ROS. Aunque la concentración de glucosa utilizada (10 mM) se encuentra dentro del rango normal de la concentración de glucosa en la sangre (Andrikopoulos *et al.*, 2008), quisimos descartar que las células, al pasar de una situación de ayuno a otra con una concentración alta de glucosa desarrollaban un estrés oxidativo como ocurre durante la hiperglucemia. Esta aumenta el flujo de electrones a través de la cadena de transporte electrónico de la membrana interna mitocondrial con el consiguiente incremento de formación de O_2^- que, entre otros procesos, puede reaccionar con H_2O y formar H_2O_2 . Habitualmente, para evitar el daño celular causado por un aumento en los niveles de ROS se estimula la autofagia. Aunque aún se desconoce bastante acerca de los mecanismos que regulan ese aumento de la autofagia por ROS, algunas proteínas implicadas en ella son sensibles al aumento de ROS. Por ejemplo, se sabe que la oxidación de mTORC1 por ROS inhibe su actividad, por lo que se induce la autofagia (Lee *et al.*, 2012a). Asimismo, se ha descrito que la autofagia también puede ser estimulada por ROS a través de la activación de las quinasas AMPK (Li *et al.*, 2013) o ERK1/2 (Gong *et al.*, 2012), lo que indicaría una señalización realmente muy compleja.

En nuestros experimentos, la adición de glucosa no producía un aumento en los niveles de ROS con respecto a los existentes en ausencia de glucosa sino un descenso. Estos niveles eran similares (aunque ligeramente mayores) a los obtenidos al incubar las células en medio completo. Por lo tanto, el incremento de la autofagia inducido por glucosa que se observa en esos experimentos no se puede deber a un aumento en los niveles de ROS. Nuestros resultados coinciden también en parte con los de Li *et al.* (2013), en los que la privación de glucosa produce un incremento en los niveles de ROS que conlleva un aumento de la autofagia a través de la activación de AMPK. En nuestros resultados también se observa esa activación de AMPK durante la privación de glucosa, condición en la que ocurre un aumento de los niveles de ROS. Sin embargo, a diferencia del trabajo anterior (Li *et al.*, 2013), nuestros datos no muestran una mayor inducción de la autofagia producida por la privación de glucosa, el aumento de los niveles de ROS y la activación de AMPK.

También se consideró que la energía proporcionada por la glucosa pudiera ser la responsable del incremento en la autofagia. Durante la degradación lisosomal, tal y como ya establecieron Plomp *et al.* (1987), es necesario el ATP. Actualmente sabemos que esta necesidad de ATP por los lisosomas para ejercer su función deriva al menos de: i) el secuestro de material citosólico en los autofagosomas y ii) el mantenimiento de la actividad de la bomba de protones en la membrana lisosomal (Kane, 2006). Puesto que una gran parte de la energía celular en forma de ATP procede del metabolismo de la glucosa, es lógico considerar que la energía proporcionada por la glucosa es importante para el correcto funcionamiento de una autofagia inducida como aquí ocurre.

Para comprobar esto, determinamos en primer lugar los niveles de ATP en células incubadas en medio de Krebs-Henseleit con y sin glucosa. Como era de esperar, los niveles de ATP eran mayores en presencia de glucosa y la adición de cantidades crecientes de este azúcar producía un incremento en la concentración de ATP. Después, comparamos los niveles producidos de ATP con los de LC3-II y encontramos que la autofagia no tiene lugar hasta que la concentración de glucosa no alcanza una concentración mínima entre 0,5 y 1 mM, y que a partir de esta concentración y hasta la de 10 mM no se observa un incremento mayor en los niveles de LC3-II. La cantidad de ATP que se obtiene con concentraciones de glucosa entre 0,5 y 1 mM de glucosa corresponde a un aumento entre el 15 % y el 20 % respecto a la cantidad de ATP intracelular que existe en las condiciones de privación de glucosa. Todo esto indicaría que la autofagia requiere un nivel energético mínimo para que se inicie y que por encima de este nivel no se produce un efecto adicional. Cuando se añade glucosa a las células hasta alcanzar una concentración de 1 mM (que supone un incremento entre un 15-20 % en la concentración de ATP respecto a la que existe en ausencia de glucosa), se produce un aumento de más de dos veces en los niveles de LC3-II, incremento que no crece más con concentraciones mayores de glucosa. Este último hecho obedece probablemente a la conveniencia de no estimular excesivamente la autofagia cuando se dispone ya de un alto nivel de ATP, ya que ese aumento adicional aceleraría la autodigestión celular.

Por otra parte, en presencia de inhibidores de la proteólisis lisosomal, como la leupeptina y el cloruro amónico, los niveles de ATP en ausencia de glucosa se redujeron en prácticamente un 40 %, lo que indica que en estas condiciones la autofagia es una importante fuente de energía para la célula. En cambio, en presencia de glucosa la inhibición de la autofagia aparentemente no redujo de manera apreciable los niveles de ATP, posiblemente debido a que el ATP aportado por la autofagia a la célula supone comparativamente una pequeña parte respecto al obtenido por el metabolismo de la glucosa.

Una vez que la autofagia ha sido inducida por la presencia de glucosa, la inhibición de la producción de ATP con oxamato de sodio produce un descenso en los niveles de LC3-II. Este descenso de los niveles de LC3-II ocurre de forma gradual y solo se alcanzan valores similares a los obtenidos durante la privación de glucosa con concentraciones altas de oxamato (50-100 nM) que impiden la producción de ATP. Al contrario que la inducción de la autofagia que ocurre a partir de unos niveles de ATP determinados, el descenso de forma gradual de los niveles de LC3-II con concentraciones crecientes de oxamato puede deberse a que se mantienen unos niveles de ATP por encima de los necesarios para que siga desarrollándose la autofagia. Esto puede ocurrir, por un lado, por la producción de energía por la propia autofagia y, por otro, porque a bajas concentraciones de oxamato no llega a inhibirse completamente la glucólisis. Recientemente, Xi *et al.* (2013) han descrito también una inhibición de la autofagia por una limitación en el contenido energético al incubar las células en un medio sin glucosa. Estos autores muestran que la privación de glucosa en condiciones de hipoxia produce una inhibición de la autofagia, que está ocasionada por una bajada importante en la concentración de ATP y que ocurre a través de la inhibición del complejo PI3K-Beclin1 y de una menor conjugación de Atg12 con Atg5, que es necesaria para la lipidación de LC3.

En las condiciones ensayadas, la privación de glucosa induce un aumento de los niveles de ROS, que es perjudicial para la célula, y el tratamiento con glucosa restaura los niveles energéticos existentes durante el ayuno de este nutriente. Estas condiciones pueden repercutir de forma diferente sobre la viabilidad celular, ya que la privación de glucosa implica un mayor estrés celular respecto a las células tratadas con glucosa. Sin embargo, nuestros resultados no muestran que exista una mayor muerte celular en condiciones de ausencia de glucosa. Posiblemente sea debido al corto periodo de incubación que hemos empleado en nuestros experimentos. A este respecto, hay que señalar que algunos autores encuentran que la incubación de las células en un medio sin glucosa durante 48 h induce la muerte celular a través de la autofagia (Liu *et al.*, 2007). En relación con esto, la autofagia puede estar implicada en la viabilidad celular. Por ejemplo, en modelos de mosca y ratón se ha descrito que mutaciones que afectan a la maquinaria asociada al funcionamiento de la dineína impiden la fusión entre autofagosomas y lisosomas, lo que tiene como consecuencia una menor eliminación de los agregados y un aumento de la toxicidad, como ocurre por ejemplo en la enfermedad de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2005). De acuerdo con estos datos, en nuestros experimentos observamos que la viabilidad celular se redujo de forma importante al inhibir la autofagia con el tratamiento con los dos inhibidores de la proteólisis lisosomal cloruro amónico y leupeptina. Estos resultados indican que en un medio pobre en nutrientes, como el

de Krebs-Henseleit, la autofagia permite la supervivencia celular de forma significativa, al aportar los nutrientes y la energía que son necesarias para el funcionamiento de las células. Sin embargo, la autofagia inducida por la glucosa no interviene en mayor grado a la protección celular, ya que la muerte celular observada durante el tratamiento con glucosa y los inhibidores lisosomales es similar al tratamiento en las mismas condiciones pero sin glucosa. De forma similar, la inhibición de la autofagia en *Dictyostelium* por mutaciones en los genes *Atg5*, *Atg6*, *Atg7* y *Atg8* no muestran efectos apreciables sobre el crecimiento celular en presencia de nutrientes, pero la supervivencia sí se ve reducida de forma importante durante el ayuno (Otto *et al.*, 2004). Asimismo, las levaduras deficientes en autofagia por mutaciones en los genes *Atg* no sobreviven cuando se las somete a condiciones de ayuno (Suzuki *et al.*, 2011). Igualmente en mamíferos, el bloqueo de la autofagia mediante 3-metiladenina o el silenciamiento de *Atg5* y *Beclin1* terminan por producir la muerte celular (Shi *et al.*, 2012).

Estos resultados indican que en nuestras condiciones, la autofagia fomenta la supervivencia celular pero de una forma independiente a la inducción de la autofagia por la glucosa. Además, el aumento de la autofagia por glucosa no depende de un estrés oxidativo sino sobre todo del aporte de ATP por el metabolismo de la glucosa. Sin embargo, la disponibilidad de energía no debe ser el único mecanismo que regule el proceso autofagico, sino que deben existir vías de regulación de la autofagia sensibles a la presencia de glucosa, al menos para evitar una excesiva estimulación de la autofagia en situaciones de alto contenido energético.

5.3. LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR GLUCOSA ES INDEPENDIENTE DE AMPK y mTORC1

Una vez establecido que la glucosa induce la autofagia, quisimos averiguar cuál era el mecanismo por el que se producía esta activación. En la inducción de la autofagia desempeñan un papel primordial dos quinasas: AMPK, que es un sensor de energía, y mTORC1, que es un sensor nutricional. Por eso comenzamos por investigar si cualquiera de ellas o las dos intervenían en la regulación de la autofagia en respuesta a la glucosa.

En cuanto a AMPK, su activación tiene lugar cuando aumenta la relación AMP/ATP, como ocurre por ejemplo durante la privación de glucosa. El AMP se une a la quinasa AMPK provocando un cambio conformacional que permite su fosforilación en la Thr172 y, por tanto, su activación (ver por ejemplo Priebe *et al.*, 2011). Durante la privación de glucosa observamos la fosforilación de AMPK, así como la de su quinasa LKB1 y la de su sustrato ACC, todo ello

indicativo de la activación de AMPK. Una vez activada, esta quinasa regula negativamente muchos de los procesos que implican un gasto de energía e induce aquellos que pueden suministrar ATP (Towler & Hardie, 2007). Como ya hemos comentado, la autofagia puede considerarse dentro de uno u otro grupo y su activación a través de AMPK, por ejemplo en ausencia de glucosa o de aminoácidos, puede ocurrir por un aumento del calcio intracelular (Ghislat *et al.*, 2012) con fosforilación de Ulk1 (en Ser317 y Ser777) (Kim *et al.*, 2011b) o por la inhibición de mTORC1 (Inoki *et al.*, 2006; Gwinn *et al.*, 2008). Sin embargo, nuestros resultados muestran lo contrario: la glucosa aumenta los niveles de ATP e inhibe AMPK pero sin embargo activa la autofagia. Nuestros resultados son similares en cuanto a su efecto con los obtenidos en macrófagos, en los que el tratamiento con ATP induce la autofagia, aunque esta inducción ocurre aquí a través de la activación del receptor de purinas P_2X_7 que permite la entrada a la célula del calcio extracelular (Biswas *et al.*, 2008). Debido a que el aumento de la concentración de calcio citosólico activa a la quinasa CaMKK β que también fosforila a la AMPK (Woods *et al.*, 2005), comprobamos si el tratamiento con glucosa estaba relacionado con algún cambio en la concentración del calcio intracelular. En estos experimentos observamos que los niveles de calcio intracelular aumentaban durante el descenso de ATP, mientras que disminuían cuando se recuperaban los niveles de ATP por la adición de glucosa. Esto ocurre posiblemente porque en esta condición se activan las bombas de calcio dependientes de ATP presentes en la membrana plasmática y en el retículo endoplásmico y se bombea calcio desde el citosol al espacio extracelular y al interior del retículo endoplásmico (Ivannikov *et al.*, 2010). Sin embargo, la estimulación de la autofagia por glucosa observada es independiente de la inducción de la autofagia por un aumento de los niveles de calcio debido a que este incremento ocurre en la condición de privación de glucosa.

En resumen, la fosforilación de AMPK durante la privación de glucosa responde generalmente a un incremento de los niveles de calcio y al descenso de los niveles de ATP (y aumento de los de AMP) que activan CaMKK β y LKB1, respectivamente. Sin embargo, nuestros resultados muestran que en la estimulación de la autofagia por glucosa no interviene la quinasa AMPK.

En cuanto a mTORC1, como se ha comentado en la Introducción, se trata de una quinasa sensible a la presencia de nutrientes y factores de crecimiento y que desempeña un papel clave en la regulación de la autofagia. En general está bien establecido el papel represor de mTORC1 sobre la autofagia. Por ejemplo, el uso de activadores de mTORC1 puede inhibir la autofagia inducida por la privación de glucosa (Jiao *et al.*, 2013) y esta inhibición ocurre a través de la fosforilación de Ulk1 en Ser757 por mTORC1 (Egan *et al.*, 2011). Sin embargo, aunque escasos, existen datos contradictorios referentes a la respuesta de mTORC1 a la

glucosa. Así, se ha descrito que una elevada concentración de glucosa (30 mM) activa mTORC1 e inhibe la autofagia (Kobayashi *et al.*, 2012), mientras que otros autores por el contrario han encontrado que el tratamiento con glucosa inhibe la señalización de mTORC1 y consecuentemente aumenta la autofagia (Ravikumar *et al.*, 2003).

Para comprobar si en nuestras condiciones mTORC1 jugaba algún papel, analizamos su estado de fosforilación así como el de sus sustratos. Nuestros resultados muestran una ausencia de fosforilación del sustrato de mTORC1 4EBP1 en el medio de Krebs-Henseleit sin glucosa. Por el contrario, la glucosa estimula la fosforilación de mTORC1 y 4EBP1 (en Ser2448 y Thr37/46, respectivamente). Puesto que la fosforilación de mTORC1 y de 4EBP1 indica que mTORC1 está activa y esta quinasa es considerada un inhibidor de la autofagia, la autofagia debería estar reprimida, mientras que nuestros resultados muestran lo contrario. Además, si mTORC1 inhibe la autofagia en estas condiciones Ulk1 debería estar fosforilada en Ser757 (Kim *et al.*, 2011b), tal y como ocurre en un medio completo pero no en el medio de Krebs-Henseleit.

En conclusión, todos estos resultados y consideraciones parecen descartar a AMPK y mTORC1 como los responsables de la activación de la autofagia por glucosa en nuestras condiciones.

5.4. LA GLUCOSA INDUCE LA AUTOFAGIA POR UNA VÍA DEPENDIENTE DE p38

Como hemos detallado en la Introducción, existen otras quinasas que pueden regular la autofagia de forma dependiente de glucosa, como por ejemplo PKA, ERK1/2 y p38. En levaduras, PKA se activa en presencia de glucosa e inhibe la autofagia. En células de mamífero, la glucosa puede activar a PKA (Dechant *et al.*, 2010) y la activación de PKA conduce al ensamblaje y a la activación de la V-ATPasa en la membrana de los lisosomas (Alzamora *et al.*, 2010), algo que es necesario para optimizar la actividad de las hidrolasas lisosomales y, por tanto, la degradación que ocurre en los autolisosomas. En condiciones tanto de hipoglucemia como de hiperglucemia, la activación de ERK1/2 y la estimulación de la autofagia puede ocurrir a través de la activación de AMPK (Wang *et al.*, 2009) o por el aumento de ROS (Wong *et al.*, 2010), lo que no ocurre en nuestras condiciones. Por otra parte, p38 se activa, normalmente, en respuesta a diferentes estímulos relacionados con el estrés celular, como por ejemplo un aumento en los niveles de ROS o por estrés del retículo endoplásmico, que finalmente inducen la autofagia (Liu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). ERK1/2 puede activarse por un aumento de los niveles de ROS e inducir la autofagia. Sin embargo, hemos observado que los niveles de ROS

descienden en presencia de glucosa, lo que descarta la posibilidad de que sea este estímulo el que induzca la autofagia.

Para estudiar más directamente si las MAPKs ERK1/2 y p38 están implicadas en la inducción de la autofagia por glucosa utilizamos inhibidores sintéticos de estas quinasas. Los resultados mostraron que la inhibición de ERK1/2 con PD98059 supone una reducción entre un 15-20 % en los niveles de LC3-II, pero observamos que esta reducción no ocurre solamente en condiciones de incubación con glucosa, sino también durante su ausencia, lo que nos indica que ERK1/2, que sí debe tener una función sobre la autofagia, no la estimula de forma dependiente de glucosa. En cambio, la inhibición de p38 con SB203580 redujo significativamente (en un 50 %) los niveles de LC3-II inducidos por glucosa. A continuación comprobamos que p38 se encontraba activa en presencia de glucosa, lo que se refleja por la doble fosforilación de p38 en Thr180/Tyr182 y la de algunos de sus sustratos, como CREB y ATF-2.

Para tratar de entender cómo se producía la activación de p38, estudiamos la activación de sus quinasas más conocidas, MKK3/6 y MKK4. Estas quinasas, sin embargo, no están activas en presencia de glucosa, según indicaba su ausencia de fosforilación. Por el contrario, la quinasa ASK-1, una MAP3K que actúa por encima de MKK3/6, sí se fosforila en presencia de glucosa. El hecho de que ASK-1 y p38 estén fosforiladas en presencia de glucosa, independientemente de MKK3/6, sugiere que existe otra quinasa intermedia entre ASK-1 y p38, o incluso que ASK-1 podría fosforilar directamente a p38. Comprobamos además que la fosforilación de p38 con glucosa se corresponde con su translocación desde el citosol hasta el núcleo, donde puede fosforilar a sus sustratos nucleares CREB y ATF-2 en presencia de glucosa. El transporte de p38 hacia el núcleo ocurre por el complejo dineína-dinactina y, de hecho, la despolimerización de los microtúbulos con nocodazol inhibe el transporte de p38 al núcleo (Gong *et al.*, 2010). Por tanto, todos estos resultados indican que la glucosa activa la vía de señalización ASK-1/p38 α .

Hemos comentado que la inhibición de p38 con SB203580 nos indica que esta quinasa puede regular la autofagia por glucosa. El bloqueo de la actividad de p38 resulta en la disminución de los niveles de LC3-II inducidos por la glucosa. Sin embargo, otros estudios han establecido un papel inhibitorio de p38 sobre la autofagia usando también SB203580. Por ejemplo, Corcelle *et al.* (2007) afirmaron que p38 inhibía la maduración de los autofagosomas, ya que al inhibir p38 con SB203580 se inducía la acumulación de los autofagosomas. Sin embargo, el uso de este inhibidor y de otros estructuralmente semejantes, como el SB202190, está sometido a discusión en lo que se refiere a su efecto sobre la autofagia, ya que se ha descrito que estos

inhibidores pueden inducir la formación y la acumulación de vacuolas autofágicas de una forma independiente de p38. Así, Menon *et al.* (2011) comprobaron que el SB202190 inducía en diferentes tipos celulares la formación de autolisosomas, la acidificación de vacuolas y un incremento de los niveles de LC3-II en presencia de inhibidores lisosomales, indicando todo ello una mayor formación de autofagosomas y que el flujo autofágico transcurre adecuadamente. Sin embargo, esta inducción ocurría de forma inespecífica al producirse la inhibición de la vía PI3K por el SB203580. Del mismo modo, Zhang *et al.* (2012) concluyeron que el SB203580 estimula la autofagia en células de hepatocarcinoma, tanto en condiciones de sobreexpresión como de silenciamiento de p38, lo que indica que el SB203580 induce la autofagia independientemente de esta quinasa de una manera dependiente de la fosforilación de p53 a través de AMPK y DAPK1, que finalmente resulta en un aumento de la expresión de Beclin1 y con ello de la autofagia. Por tanto, parece necesario revisar aquellos datos que relacionan la autofagia con p38 basados en el uso del inhibidor SB203580 y de otros estructuralmente similares.

Por este motivo, utilizamos también en nuestros estudios otro inhibidor de p38, el BIRB-796, que es diferente estructuralmente del SB203580. Según Menon *et al.* (2011), el inhibidor de p38 BIRB-796 no muestra esa formación y acumulación de autofagosomas y, además, no afecta a la fosforilación de las quinasas Akt, ERK1/2 o JNK1/2, como ocurre con el inhibidor SB202190. Cuando utilizamos en nuestros experimentos el inhibidor de p38 BIRB-796 obtuvimos los mismos resultados que con el SB203580. Asimismo, utilizamos también un inhibidor de la quinasa MK2, que actúa por debajo de p38 y que fosforila a CREB (Gaestel, 2006). Una vez más, y como cuando usábamos los inhibidores de p38, obteníamos los mismos resultados, observando que su uso reprime la autofagia inducida por glucosa.

Cuando contrastamos nuestros resultados con los existentes en la literatura, encontramos datos contradictorios referentes al papel de p38 en la autofagia. Por un lado, en condiciones de aporte de nutrientes la MAPK p38 inhibe la interacción p38IP-Atg9 necesaria para la autofagia, lo que indicaría un papel represor de p38 sobre la autofagia (Webber & Tooze, 2010). Además, p38 puede inhibir la autofagia, por ejemplo, a través de la fosforilación de Atg5 (en la Thr75), lo que impide la conjugación de LC3 a fosfatidiletanolamina de la membrana del autofagosoma (Keil *et al.*, 2013), o por la represión de la expresión del gen *Ulk1* (Mei *et al.*, 2012), cuya proteína codificada es necesaria para el inicio de la formación de los autofagosomas. Por el contrario, según otros autores p38 puede inducir la autofagia bajo diferentes estímulos. Así, los lipopolisacáridos activan al receptor TLR4 y este, a su vez, activa a p38 que desencadena finalmente un aumento en la formación de los autofagosomas y una

inducción de la proteólisis en los miotubos C2C12 (Doyle *et al.*, 2011). También en el mismo sentido, en los macrófagos la autofagia inducida por el IFN γ requiere la expresión de p38, entre otras quinasas (Matsuzawa *et al.*, 2012). Además se ha considerado que la mayor expresión de p38 puede inducir la autofagia para favorecer la supervivencia celular en condiciones desfavorables para las células. Esto puede verse, por ejemplo, con el tratamiento de las células con un inductor de la apoptosis, el MS-275, con el que se observa que la mayor expresión de p38 induce la autofagia, mientras que una menor expresión de esta MAPK conduce a la apoptosis (Zhan *et al.*, 2012). En definitiva, existen datos que apoyan tanto un papel inductor como uno inhibidor de p38 sobre la autofagia.

Para esclarecer esta controversia y evitar posibles malinterpretaciones por el uso de inhibidores, estudiamos también el papel de p38 sobre la inducción de la autofagia mediante el uso de RNA de interferencia. Observamos que en las células control, transfectadas con NT-siRNA, los niveles de LC3-II aumentan de forma importante en respuesta al tratamiento con glucosa, mientras que en las células con siRNA para p38 no ocurre dicho aumento por la glucosa. En la misma línea, ya que el uso de RNAs interferentes puede tener siempre algún efecto secundario (“off-target effect”), utilizamos los MEFs *p38*^{-/-}. Comprobamos que no solo se producía una inhibición en el aumento de la cantidad de LC3-II inducido por glucosa, sino que mediante experimentos de pulso y caza, observamos que la glucosa no ejercía ningún papel en la inducción de la degradación intracelular de proteínas. Por lo tanto, podemos concluir que la quinasa p38 α es necesaria para que se produzca una inducción de la autofagia mediada por glucosa.

Finalmente, a partir de los resultados obtenidos y que están basados en el uso de distintos inhibidores de p38, en la supresión de la expresión de p38 mediante RNA de interferencia o en el uso de células MEF *p38*^{-/-}, concluimos que la glucosa induce la autofagia por una vía dependiente de la MAPK p38.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A partir de los objetivos planteados inicialmente podemos resumir las conclusiones más destacadas del estudio en los siguientes puntos:

En cuanto a los efectos de la glucosa sobre las principales vías de degradación intracelular de proteínas:

- a. La glucosa induce la macroautofagia a través del incremento en la formación de los autofagosomas que finalmente se traduce en un aumento del porcentaje de proteína degradada. Este incremento en la formación de los autofagosomas ocurre en todos los tipos celulares analizados y su intensidad depende de la presencia o no de otros reguladores de la macroautofagia, como suero o aminoácidos.
- b. La glucosa también estimula la vía ubiquitina-proteasomas en las dos fases que intervienen en el proceso, es decir, tanto aumentando la poliubiquitinación de proteínas como incrementando la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas. Esta estimulación no es, sin embargo, tan acusada como la observada en la macroautofagia.

En cuanto a la vía de señalización implicada en la activación de la macroautofagia dependiente de la glucosa:

- c. La inducción de la macroautofagia por el tratamiento con glucosa no parece ocurrir como respuesta a un incremento en el estrés oxidativo de las células, ya que este azúcar reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno, sino que se debe al aumento en los niveles energéticos de la célula.
- d. La inducción de la formación de los autofagosomas es dependiente de los niveles de ATP generados a partir del metabolismo de la glucosa. La inhibición de la producción de ATP, aún en presencia de glucosa, produce un descenso paulatino de los niveles de LC3-II. Sin embargo, con el aumento gradual del ATP no se produce un incremento proporcional de la autofagia, lo que sugiere que existe un umbral de mínima disponibilidad energética a partir del que se desencadena la formación de los autofagosomas. Una vez iniciada la autofagia, un mayor incremento en los niveles de ATP no inducen un mayor grado de formación de los autofagosomas.
- e. Durante el tratamiento con glucosa y durante la privación de esta se activan, respectivamente, las quinasas mTORC1 y AMPK, que son las más frecuentemente implicadas en la regulación de la macroautofagia. Sin embargo, la inducción de la autofagia por glucosa es independiente de estas quinasas.

- f. La autofagia inducida por glucosa depende de la quinasa p38. La glucosa activa por fosforilación a p38, lo que induce su translocación al núcleo. Esta quinasa induce la autofagia a través de un incremento en la formación de autofagosomas con el consiguiente aumento del porcentaje de proteína degradada.

ANEXOS

7. ANEXOS

TABLA I. Inhibidores utilizados

INHIBIDOR	DIANA/S PRINCIPAL/ES	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
3-metiladenina	PI3K	Sigma-Aldrich	M9281
BIRB-796	p38	Selleck Chemicals ¹	S1574
Cicloheximida	Traducción (elongación)	Sigma-Aldrich	C6255
KT5720	PKA	Calbiochem ²	K3761
Leupeptina	Serina y cisteína proteasas	Peptide Institute ³	4041
LY294002	PI3K	Calbiochem	440202
MG132	Proteasomas	Biomol ⁴	PI-102
“MK2 inhibitor”	MK2	Calbiochem	475863
Oxamato de sodio	Lactato deshidrogenasa	Sigma-Aldrich	O2751
PD98059	ERK1/2	Calbiochem	513000
PMSF	Serina proteasas	Sigma-Aldrich	P-7626
Rapamicina	mTORC1	Calbiochem	553210
SB203580	p38	Calbiochem	59398

¹ Selleck Chemicals (Houston, TX, EE.UU.)² Calbiochem (San Diego, CA, EE.UU.)³ Peptide Institute (Osaka, Japón)⁴ Biomol (Plymouth Meeting, PA, EE.UU.)

TABLA II. Anticuerpos utilizados

PROTEÍNA RECONOCIDA	DILUCIÓN (OBTENIDO EN* /TÉCNICA**)	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
4EBP1	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling ¹	9452
P-4EBP1 (Thr37/46)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9459
ACC	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	3662
P-ACC (Ser79)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	3661
Actina	1:4000 (Rb/WB)	Sigma-Aldrich	A-2066
AMPK	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	2532
P-AMPK (Thr172)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	2535
P-ASK-1 (Thr845)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	3765
ATF-2	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9226
P-ATF-2 (Thr71)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9221
Caspasa-3	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9662
CREB	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9197
P-CREB (Ser133)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9198
LC3	1:500 (Ms/WB)	NanoTools ²	0231
LKB1	1:1000 (Rb/WB)	Abcam ³	ab58786
P-LKB1 (Ser428)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	3051
MKK3/6	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9238
P-MKK3/6 (Ser189/207)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9231
MKK4	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9152
P-MKK4 (Ser257/Thr261)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9156
mTOR	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	2972

TABLA II (continuación). Anticuerpos utilizados

PROTEINA RECONOCIDA	DILUCIÓN (OBTENIDO EN* /TÉCNICA**)	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
P-mTOR (Ser2448)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	2971
p38	1:1000 (Rb/WB)	Santa Cruz ⁴	Sc-535
P-p38 (Thr180/Tyr182)	1:1000 o 1:200 (Ms/WB o IF)	Cell Signaling	9216
p70S6K	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9202
P-p70S6K (Thr389)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9205
PARP	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	9542
Tubulina	1:4000 (Rt/WB)	Abcam	ab6160
Ulk1	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	4776
P-Ulk1 (Ser757)	1:1000 (Rb/WB)	Cell Signaling	6888

*Anticuerpo primario obtenido en: Rb (conejo), Ms (ratón) o Rt (rata)

**WB: "Western-blot", IF; inmunofluorescencia

¹ Cell Signaling (Beverly, MA, EE.UU.)

² NanoTools (Teningen, Alemania)

³ Abcam (Cambridge, Reino Unido)

⁴ Santa Cruz (Santa Cruz, CA, EE.UU)

TABLA III. Anticuerpos secundarios utilizados

ANTICUERPO SECUNDARIO	DILUCIÓN (OBTENIDO EN* /TÉCNICA**)	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
IgG de ratón-Alexa 594	1:100 (Gt/IF)	Invitrogen	11012
IgG de ratón-HRP	1:5000-1:7000 (Gt/WB)	Sigma	A-4416
IgG de conejo-HRP	1:7000 (Gt/WB)	Sigma	A-6154
IgG de rata-HRP	1:7000 (Gt/WB)	Sigma	A-9037

*Anticuerpo secundario obtenido en: Gt (cabra)

**WB: "Western-blot", IF; inmunofluorescencia

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aguado, C., Sarkar, S., Korolchuk, V. I., Criado, O., Vernia, S., *et al.* (2010) Laforin, the most common protein mutated in Lafora disease, regulates autophagy. *Hum Mol Genet* **19**, 2867-2876.
- Alers, S., Loffler, A. S., Wesselborg, S., and Stork, B. (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* **32**, 2-11.
- Al-Kafaji, G., and Golbahar, J. (2013) High glucose-induced oxidative stress increases the copy number of mitochondrial DNA in human mesangial cells. *Biomed Res Int* **2013**, 754946.
- Alzamora, R., Thali, R. F., Gong, F., Smolak, C., Li, H., *et al.* (2010) PKA regulates vacuolar H⁺-ATPase localization and activity via direct phosphorylation of the a subunit in kidney cells. *J Biol Chem* **285**, 24676-24685.
- Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C., and Proietto, J. (2008) Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **295**, 1323-1332.
- Askari, N., Beenstock, J., Livnah, O., and Engelberg, D. (2009) p38 α is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at Thr180. *Biochemistry* **48**, 2497-2504.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., *et al.* (2008) Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., and Ohsumi, Y. (1994) Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J Cell Biol* **124**, 903-913.
- Besson, A., Dowdy, S. F., and Roberts, J. M. (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* **14**, 159-169.
- Biswas, D., Qureshi, O. S., Lee, W. Y., Croudace, J. E., Mura, M., *et al.* (2008) ATP-induced autophagy is associated with rapid killing of intracellular mycobacteria within human monocytes/macrophages. *BMC Immunol* **9**, 35.
- Boutet, S. C., Disatnik, M. H., Chan, L. S., Iori, K., and Rando, T. A. (2007) Regulation of Pax3 by proteasomal degradation of monoubiquitinated protein in skeletal muscle progenitors. *Cell* **130**, 349-362.
- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., *et al.* (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* **346**, 155-161.

- Brown, C. R., and Chiang, H. L. (2009) A selective autophagy pathway that degrades gluconeogenic enzymes during catabolite inactivation. *Commun Integr Biol* **2**, 177-183.
- Budanov, A. V., and Karin, M. (2008) p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. *Cell* **134**, 451-460.
- Buss, S. J., Muenz, S., Riffel, J. H., Malekar, P., Hagenmueller, M., *et al.* (2009) Beneficial effects of mammalian target of rapamycin inhibition on left ventricular remodeling after myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* **54**, 2435-2446.
- Casarejos, M. J., Solano, R. M., Gómez, A., Perucho, J., de Yébenes, J. G., *et al.* (2011) The accumulation of neurotoxic proteins, induced by proteasome inhibition, is reverted by trehalose, an enhancer of autophagy, in human neuroblastoma cells. *Neurochem Int* **58**, 512-520.
- Chan, S. H., Kikkawa, U., Matsuzaki, H., Chen, J. H., and Chang, W. C. (2012) Insulin receptor substrate-1 prevents autophagy-dependent cell death caused by oxidative stress in mouse NIH/3T3 cells. *J Biomed Sci* **19**, 64.
- Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., and Dou, Q. P. (2011a) Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* **11**, 239-253.
- Chen, X., Kintner, D. B., Baba, A., Matsuda, T., Shull, G. E., *et al.* (2010) Protein aggregation in neurons following OGD: a role for Na⁺ and Ca²⁺ ionic dysregulation. *J Neurochem* **112**, 173-182.
- Chen, Y. W., Chenier, I., Chang, S. Y., Tran, S., Ingelfinger, J. R., *et al.* (2011b) High glucose promotes nascent nephron apoptosis via NF-κB and p53 pathways. *Am J Physiol Renal Physiol* **300**, 147-156.
- Chen, Y., and Klionsky, D. J. (2011) The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci* **124**, 161-170.
- Chondrogianni, N., and Gonos, E. S. (2012) Structure and function of the ubiquitin-proteasome system: modulation of components. *Prog Mol Biol Transl Sci* **109**, 41-74.
- Choo, A. Y., Kim, S. G., van der Heiden, M. G., Mahoney, S. J., Vu, H., *et al.* (2010) Glucose addiction of TSC null cells is caused by failed mTORC1-dependent balancing of metabolic demand with supply. *Mol Cell* **38**, 487-499.
- Codogno, P., and Meijer, A. J. (2005) Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* **12**, 1509-1518.
- Comb, W. C., Hutti, J. E., Cogswell, P., Cantley, L. C., and Baldwin, A. S. (2012) p85α SH₂ domain phosphorylation by IKK promotes feedback inhibition of PI3K and Akt in response to cellular starvation. *Mol Cell* **45**, 719-730.

- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F. C., *et al.* (2007) A novel cell type-specific role of p38 α in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ* **14**, 693-702.
- Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., *et al.* (2007) Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy* **3**, 57-59.
- Corcelle, E., Nebout, M., Bekri, S., Gauthier, N., Hofman, P., *et al.* (2006) Disruption of autophagy at the maturation step by the carcinogen lindane is associated with the sustained mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase activity. *Cancer Res* **66**, 6861-6870.
- Costes, S., Vandewalle, B., Turrel-Cuzin, C., Broca, C., Linck, N., *et al.* (2009) Degradation of cAMP-responsive element-binding protein by the ubiquitin-proteasome pathway contributes to glucotoxicity in β -cells and human pancreatic islets. *Diabetes* **58**, 1105-1115.
- Criollo, A., Niso-Santano, M., Malik, S. A., Michaud, M., Morselli, E., *et al.* (2011) Inhibition of autophagy by TAB2 and TAB3. *EMBO J* **30**, 4908-4920.
- Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M. C., Morselli, E., *et al.* (2010) The IKK complex contributes to the induction of autophagy. *EMBO J* **29**, 619-631.
- Cuadrado, A., and Nebreda, A. R. (2010) Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**, 403-417.
- David, E., Kaufman, J. L., Flowers, C. R., Schafer-Hales, K., Torre, C., *et al.* (2010) Tipifarnib sensitizes cells to proteasome inhibition by blocking degradation of bortezomib-induced aggresomes. *Blood* **116**, 5285-5288.
- de Chiara, G., Marcocci, M. E., Torcia, M., Lucibello, M., Rosini, P., *et al.* (2006) Bcl-2 Phosphorylation by p38 MAPK: identification of target sites and biologic consequences. *J Biol Chem* **281**, 21353-21361.
- de Duve, C. (1983) Lysosomes revisited. *Eur J Biochem* **137**, 391-397.
- Dechant, R., Binda, M., Lee, S. S., Pelet, S., Winderickx, J., *et al.* (2010) Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J* **29**, 2515-2526.
- di Ciccio, J. E., and Steinberg, B. E. (2011) Lysosomal pH and analysis of the counter ion pathways that support acidification. *J Gen Physiol* **137**, 385-390.
- Doyle, A., Zhang, G., Abdel Fattah, E. A., Eissa, N. T., and Li, Y. P. (2011) Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced muscle catabolism via coordinate activation of ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways. *FASEB J* **25**, 99-110.

- Duan, X., Ponomareva, L., Veeranki, S., and Choubey, D. (2011) IFI16 induction by glucose restriction in human fibroblasts contributes to autophagy through activation of the ATM/AMPK/p53 pathway. *PLoS One* **6**, e19532.
- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., and McLean, P. J. (2012) Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol* **124**, 153-172.
- Edelmann, M. J., Nicholson, B., and Kessler, B. M. (2011) Pharmacological targets in the ubiquitin system offer new ways of treating cancer, neurodegenerative disorders and infectious diseases. *Expert Rev Mol Med* **13**, e35.
- Egan, D. F., Shackelford, D. B., Mihaylova, M. M., Gelino, S., Kohnz, R. A., *et al.* (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**, 456-461.
- Essick, E. E., and Sam, F. (2010) Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid Med Cell Longev* **3**, 168-177.
- Esteban, I., Aguado, C., Sanchez, M., and Knecht, E. (2007) Regulation of various proteolytic pathways by insulin and amino acids in human fibroblasts. *FEBS Lett* **581**, 3415-3421.
- Esteve, J. M., and Knecht, E. (2011) Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells. *World J Biol Chem* **2**, 232-238.
- Esteve, J. M., Armengod, M. E., and Knecht, E. (2010) BRCA1 negatively regulates formation of autophagic vacuoles in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* **316**, 2618-2629.
- Eto, I. (2011) Upstream molecular signaling pathways of p27Kip1 expression in human breast cancer cells in vitro: differential effects of 4-hydroxytamoxifen and deficiency of either D-(+)-glucose or L-leucine. *Cancer Cell Int* **11**, 31.
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., *et al.* (2011) Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* **7**, 727-736.
- Fabbro, M., and Henderson, B. R. (2003) Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. *Exp Cell Res* **282**, 59-69.
- Feng, Z., Hu, W., de Stanchina, E., Teresky, A. K., Jin, S., *et al.* (2007) The regulation of AMPK β 1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **67**, 3043-3053.
- Fernandes, R., Girao, H., and Pereira, P. (2004) High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem* **279**, 27219-27224.

- Franco, S. J., and Huttenlocher, A. (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J Cell Sci* **118**, 3829-3838.
- Freshney, R. I. (2010) *Culture of animal cells*. 6th ed. Hoboken (NJ). 110p.
- Fry, M. R., Thomson, J. M., Tomasini, A. J., and Dunn, W. A., Jr. (2006) Early and late molecular events of glucose-induced pexophagy in *Pichia pastoris* require Vac8. *Autophagy* **2**, 280-288.
- Fuertes, G., Martin de Llano, J. J., Villarroya, A., Rivett, A. J., and Knecht, E. (2003) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* **375**, 75-86.
- Gaestel, M. (2006) MAPKAP kinases - MKs - two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-130.
- Ge, B., Gram, H., Di Padova, F., Huang, B., New, L., *et al.* (2002) MAPKK-independent activation of p38 α mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38 α . *Science* **295**, 1291-1294.
- Ge, B., Xiong, X., Jing, Q., Mosley, J. L., Filose, A., *et al.* (2003) TAB1 β (transforming growth factor- β -activated protein kinase 1-binding protein 1 β), a novel splicing variant of TAB1 that interacts with p38 α but not TAK1. *J Biol Chem* **278**, 2286-2293.
- Gerlach, B., Cordier, S. M., Schmukle, A. C., Emmerich, C. H., Rieser, E., *et al.* (2011) Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature* **471**, 591-596.
- Ghislat, G., and Knecht, E. (2012) New Ca²⁺-dependent regulators of autophagosome maturation. *Commun Integr Biol* **5**, 308-311.
- Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R., and Knecht, E. (2012) Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β). *J Biol Chem* **287**, 38625-38636.
- Giacco, F., and Brownlee, M. (2010) Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* **107**, 1058-1070.
- Godin, J. D., Poizat, G., Hickey, M. A., Maschat, F., and Humbert, S. (2010) Mutant huntingtin-impaired degradation of β -catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J* **29**, 2433-2445.
- Gong, K., Chen, C., Zhan, Y., Chen, Y., Huang, Z., *et al.* (2012) Autophagy-related gene 7 (*Atg7*) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* **287**, 35576-35588.

- Gong, X., Ming, X., Deng, P., and Jiang, Y. (2010) Mechanisms regulating the nuclear translocation of p38 MAP kinase. *J Cell Biochem* **110**, 1420-1429.
- González, C. D., Lee, M. S., Marchetti, P., Pietropaolo, M., Towns, R., *et al.* (2011) The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy* **7**, 2-11.
- Green, M. F., Anderson, K. A., and Means, A. R. (2011) Characterization of the CaMKK β -AMPK signaling complex. *Cell Signal* **23**, 2005-2012.
- Gurusamy, N., and Das, D. K. (2009) Autophagy, redox signaling, and ventricular remodeling. *Antioxid Redox Signal* **11**, 1975-1988.
- Gwinn, D. M., Shackelford, D. B., Egan, D. F., Mihaylova, M. M., Mery, A., *et al.* (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**, 214-226.
- Han, D., Yang, B., Olson, L. K., Greenstein, A., Baek, S. H., *et al.* (2010) Activation of autophagy through modulation of 5'-AMP-activated protein kinase protects pancreatic β -cells from high glucose. *Biochem J* **425**, 541-551.
- Hardie, D. G. (2005) New roles for the LKB1 \rightarrow AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 167-173.
- Hardie, D. G. (2011) AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes Dev* **25**, 1895-1908.
- Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 251-262.
- Hariharan, N., Maejima, Y., Nakae, J., Paik, J., Depinho, R. A., *et al.* (2010) Deacetylation of FoxO by Sirt1 plays an essential role in mediating starvation-induced autophagy in cardiac myocytes. *Circ Res* **107**, 1470-1482.
- Haussinger, D., Schliess, F., Dombrowski, F., and Vom Dahl, S. (1999) Involvement of p38 MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* **116**, 921-935.
- Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., *et al.* (2003) Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD α/β and MO25 α/β are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* **2**, 28.
- He, C., and Klionsky, D. J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**, 67-93.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**, 425-479.
- Hershko, A., Leshinsky, E., Ganoth, D., and Heller, H. (1984) ATP-dependent degradation of ubiquitin-protein conjugates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 1619-1623.

- Hoglinger, G. U., Carrard, G., Michel, P. P., Medja, F., Lombes, A., *et al.* (2003) Dysfunction of mitochondrial complex I and the proteasome: interactions between two biochemical deficits in a cellular model of Parkinson's disease. *J Neurochem* **86**, 1297-1307.
- Horak, J., Regelman, J., and Wolf, D. H. (2002) Two distinct proteolytic systems responsible for glucose-induced degradation of fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* share the same protein components of the glucose signaling pathway. *J Biol Chem* **277**, 8248-8254.
- Hoshino, D., Tomari, T., Nagano, M., Koshikawa, N., and Seiki, M. (2009) A novel protein associated with membrane-type 1 matrix metalloproteinase binds p27Kip1 and regulates RhoA activation, actin remodeling, and matrigel invasion. *J Biol Chem* **284**, 27315-27326.
- Hosokawa, N., Hara, T., Kaizuka, T., Kishi, C., Takamura, A., *et al.* (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**, 1981-1991.
- Hutschenreiter, S., Tinazli, A., Model, K., and Tampe, R. (2004) Two-substrate association with the 20S proteasome at single-molecule level. *EMBO J* **23**, 2488-2497.
- Ihara, Y., Morishima-Kawashima, M., and Nixon, R. (2012) The ubiquitin-proteasome system and the autophagic-lysosomal system in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**, a006361.
- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., *et al.* (2006) TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation by AMPK and GSK3 to regulate cell growth. *Cell* **126**, 955-968.
- Ivannikov, M. V., Sugimori, M., and Llinas, R. R. (2010) Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons. *Cell Calcium* **47**, 507-513.
- Jiang, Y., Davis, C., and Broach, J. R. (1998) Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *EMBO J* **17**, 6942-6951.
- Jiao, H., Zhang, Z., Ma, Q., Fu, W., and Liu, Z. (2013) Mechanism underlying the inhibitory effect of Apelin-13 on glucose deprivation-induced autophagy in rat cardiomyocytes. *Exp Ther Med* **5**, 797-802.
- Jones, R. G., Plas, D. R., Kubek, S., Buzzai, M., Mu, J., *et al.* (2005) AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* **18**, 283-293.
- Kadowaki, M., Karim, M. R., Carpi, A., and Miotto, G. (2006) Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Aspects Med* **27**, 426-443.
- Kane, P. M. (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 177-191.

- Kaneto, H., Nakatani, Y., Miyatsuka, T., Kawamori, D., Matsuoka, T. A., *et al.* (2004) Possible novel therapy for diabetes with cell-permeable JNK-inhibitory peptide. *Nat Med* **10**, 1128-1132.
- Kang, R., Zeh, H. J., Lotze, M. T., and Tang, D. (2011) The Beclin1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**, 571-580.
- Kanki, T., Klionsky, D. J., and Okamoto, K. (2011) Mitochondria autophagy in yeast. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1989-2001.
- Kaushik, S., Bandyopadhyay, U., Sridhar, S., Kiffin, R., Martinez-Vicente, M., *et al.* (2011) Chaperone-mediated autophagy at a glance. *J Cell Sci* **124**, 495-499.
- Keane, P. C., Kurzawa, M., Blain, P. G., and Morris, C. M. (2011) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Parkinsons Dis* **2011**, 716871.
- Keil, E., Hocker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., *et al.* (2013) Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death Differ* **20**, 321-332.
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., and Cuervo, A. M. (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **15**, 4829-4840.
- Kim, D. S., Kim, J. H., Lee, G. H., Kim, H. T., Lim, J. M., *et al.* (2010) p38 Mitogen-activated protein kinase is involved in endoplasmic reticulum stress-induced cell death and autophagy in human gingival fibroblasts. *Biol Pharm Bull* **33**, 545-549.
- Kim, J. H., Kim, H. Y., Lee, Y. K., Yoon, Y. S., Xu, W. G., *et al.* (2011a) Involvement of mitophagy in oncogenic K-Ras-induced transformation: overcoming a cellular energy deficit from glucose deficiency. *Autophagy* **7**, 1187-1198.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K. L. (2011b) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**, 132-141.
- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**, 109-122.
- Kisselev, A. F., and Goldberg, A. L. (2005) Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* **398**, 364-378.
- Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., *et al.* (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544.
- Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., *et al.* (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151-175.

- Knecht, E., Aguado, C., Carcel, J., Esteban, I., Esteve, J. M., *et al.* (2009) Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2427-2443.
- Knecht, E., Hernandez-Yago, J., and Grisolia, S. (1984) Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp Cell Res* **154**, 224-232.
- Knowlton, J. R., Johnston, S. C., Whitby, F. G., Realini, C., Zhang, Z., *et al.* (1997) Structure of the proteasome activator REG α (PA28 α). *Nature* **390**, 639-643.
- Kobayashi, S., Xu, X., Chen, K., and Liang, Q. (2012) Suppression of autophagy is protective in high glucose-induced cardiomyocyte injury. *Autophagy* **8**, 577-592.
- Komander, D. (2009) The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans* **37**, 937-953.
- Kravtsova-Ivantsiv, Y., and Ciechanover, A. (2012) Non-canonical ubiquitin-based signals for proteasomal degradation. *J Cell Sci* **125**, 539-548.
- Kuma, A., Matsui, M., and Mizushima, N. (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* **3**, 323-328.
- Kurz, T., Terman, A., Gustafsson, B., and Brunk, U. T. (2008) Lysosomes in iron metabolism, ageing and apoptosis. *Histochem Cell Biol* **129**, 389-406.
- Lamkanfi, M., Festjens, N., Declercq, W., van den Berghe, T., and van den Abeele, P. (2007) Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ* **14**, 44-55.
- Lander, G. C., Estrin, E., Matyskiela, M. E., Bashore, C., Nogales, E., *et al.* (2012) Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature* **482**, 186-191.
- Lecker, S. H., Goldberg, A. L., and Mitch, W. E. (2006) Protein degradation by the ubiquitin-proteasome pathway in normal and disease states. *J Am Soc Nephrol* **17**, 1807-1819.
- Lee, I. H., Cao, L., Mostoslavsky, R., Lombard, D. B., Liu, J., *et al.* (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 3374-3379.
- Lee, J., Giordano, S., and Zhang, J. (2012) Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* **441**, 523-540.
- Lee, S. M., Kim, J. H., Cho, E. J., and Youn, H. D. (2009) A nucleocytoplasmic malate dehydrogenase regulates p53 transcriptional activity in response to metabolic stress. *Cell Death Differ* **16**, 738-748.
- Lee, Y., Lee, H. Y., and Gustafsson, A. B. (2012) Regulation of autophagy by metabolic and stress signaling pathways in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* **60**, 118-124.

- Levine, B., and Kroemer, G. (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
- Li, L., Chen, Y., and Gibson, S. B. (2013) Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal* **25**, 50-65.
- Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z. X., Hennessy, B., Ding, Z., *et al.* (2007) The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27Kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* **9**, 218-224.
- Liu, B., Cheng, Y., Zhang, B., Bian, H. J., and Bao, J. K. (2009) *Polygonatum cyrtoneuma* lectin induces apoptosis and autophagy in human melanoma A375 cells through a mitochondria-mediated ROS-p38-p53 pathway. *Cancer Lett* **275**, 54-60.
- Liu, K., Tang, Q., Fu, C., Peng, J., Yang, H., *et al.* (2007) Influence of glucose starvation on the pathway of death in insect cell line SI: apoptosis follows autophagy. *Cytotechnology* **54**, 97-105.
- Liu, Y., Song, X. D., Liu, W., Zhang, T. Y., and Zuo, J. (2003) Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* **7**, 49-56.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Luitse, M. J., Biessels, G. J., Rutten, G. E., and Kappelle, L. J. (2012) Diabetes, hyperglycaemia, and acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* **11**, 261-271.
- Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., *et al.* (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**, 237-248.
- Luo, Y., Zou, P., Zou, J., Wang, J., Zhou, D., *et al.* (2011) Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. *Exp Gerontol* **46**, 860-867.
- Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Morselli, E., Kepp, O., Malik, S. A., *et al.* (2010) Autophagy regulation by p53. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 181-185.
- Marambio, P., Toro, B., Sanhueza, C., Troncoso, R., Parra, V., *et al.* (2010) Glucose deprivation causes oxidative stress and stimulates aggresome formation and autophagy in cultured cardiac myocytes. *Biochim Biophys Acta* **1802**, 509-518.
- Marchi, S., Giorgi, C., Suski, J. M., Agnoletto, C., Bononi, A., *et al.* (2012) Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct* **2012**, 329635.
- Maruyama, R., Goto, K., Takemura, G., Ono, K., Nagao, K., *et al.* (2008) Morphological and biochemical characterization of basal and starvation-induced autophagy in isolated adult rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **295**, 1599-1607.

- Matsui, Y., Takagi, H., Qu, X., Abdellatif, M., Sakoda, H., *et al.* (2007) Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* **100**, 914-922.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., *et al.* (2009) Two Beclin1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**, 385-396.
- Matsuzawa, T., Kim, B. H., Shenoy, A. R., Kamitani, S., Miyake, M., *et al.* (2012) IFN- γ elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway. *J Immunol* **189**, 813-818.
- McAlpine, F., Williamson, L. E., Tooze, S. A., and Chan, E. Y. (2013) Regulation of nutrient-sensitive autophagy by uncoordinated 51-like kinases 1 and 2. *Autophagy* **9**, 361-373.
- McClung, J. M., Judge, A. R., Powers, S. K., and Yan, Z. (2010) p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, 542-549.
- McDowell, G. S., Kucerova, R., and Philpott, A. (2010) Non-canonical ubiquitylation of the proneural protein Ngn2 occurs in both *Xenopus* embryos and mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **400**, 655-660.
- Mei, S., Gu, H., Ward, A., Yang, X., Guo, H., *et al.* (2012) p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) promotes cholesterol ester accumulation in macrophages through inhibition of macroautophagy. *J Biol Chem* **287**, 11761-11768.
- Meijer, A. J., and Codogno, P. (2007) AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy* **3**, 238-240.
- Menon, M. B., Kotlyarov, A., and Gaestel, M. (2011) SB202190-induced cell type-specific vacuole formation and defective autophagy do not depend on p38 MAP Kinase inhibition. *PLoS One* **6**, e23054.
- Meyer, H. J., and Rape, M. (2011) Processive ubiquitin chain formation by the anaphase-promoting complex. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 544-550.
- Mijaljica, D., Prescott, M., and Devenish, R. J. (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* **7**, 673-682.
- Mizushima, N. (2007) Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861-2873.
- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Marino, G., Michaud, M., *et al.* (2011) Oncosuppressive functions of autophagy. *Antioxid Redox Signal* **14**, 2251-2269.
- Murata, S., Yashiroda, H., and Tanaka, K. (2009) Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 104-115.

- Nagai, H., Noguchi, T., Takeda, K., and Ichijo, H. (2007) Pathophysiological roles of ASK1-MAP kinase signaling pathways. *J Biochem Mol Biol* **40**, 1-6.
- Nagano, Y., Fukushima, T., Okemoto, K., Tanaka, K., Bowtell, D. D., et al. (2011) Siah1/SIP regulates p27Kip1 stability and cell migration under metabolic stress. *Cell Cycle* **10**, 2592-2602.
- Naito, T., Kuma, A., and Mizushima, N. (2013) Differential contribution of insulin and amino acids to the mTORC1-autophagy pathway in the liver and muscle. *J Biol Chem* **288**, 21074-21081.
- Nakatani, Y., Kaneto, H., Kawamori, D., Yoshiuchi, K., Hatazaki, M., et al. (2005) Involvement of endoplasmic reticulum stress in insulin resistance and diabetes. *J Biol Chem* **280**, 847-851.
- Nazarko, V. Y., Futej, K. O., Thevelein, J. M., and Sibirny, A. A. (2008a) Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy* **4**, 381-384.
- Nazarko, V. Y., Thevelein, J. M., and Sibirny, A. A. (2008b) G-protein-coupled receptor Gpr1 and G-protein Gpa2 of cAMP-dependent signaling pathway are involved in glucose-induced pexophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biol Int* **32**, 502-504.
- Odet, F., Gabel, S. A., Williams, J., London, R. E., Goldberg, E., et al. (2011) Lactate dehydrogenase C and energy metabolism in mouse sperm. *Biol Reprod* **85**, 556-564.
- O'Donnell, M. A., Perez-Jimenez, E., Oberst, A., Ng, A., Massoumi, R., et al. (2011) Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol* **13**, 1437-1442.
- Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El Benna, J., and Codogno, P. (2000) Erk1/2-dependent phosphorylation of G α -interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J Biol Chem* **275**, 39090-39095.
- Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., and Kessin, R. H. (2004) *Dictyostelium* macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects. *J Biol Chem* **279**, 15621-15629.
- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., et al. (1996) Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem J* **316**, 401-407.
- Pan, J., Zhang, Q., Wang, Y., and You, M. (2010) 26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated in vitro. *PLoS One* **5**, e13298.
- Plomp, P. J., Wolvetang, E. J., Groen, A. K., Meijer, A. J., Gordon, P. B., et al. (1987) Energy dependence of autophagic protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Eur J Biochem* **164**, 197-203.

- Pop, C., and Salvesen, G. S. (2009) Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**, 21777-21781.
- Priebe, A., Tan, L., Wahl, H., Kueck, A., He, G., *et al.* (2011) Glucose deprivation activates AMPK and induces cell death through modulation of Akt in ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol* **122**, 389-395.
- Ramana, K. V., Friedrich, B., Srivastava, S., Bhatnagar, A., and Srivastava, S. K. (2004) Activation of nuclear factor- κ B by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes* **53**, 2910-2920.
- Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., *et al.* (2005) Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat Genet* **37**, 771-776.
- Ravikumar, B., Stewart, A., Kita, H., Kato, K., Duden, R., *et al.* (2003) Raised intracellular glucose concentrations reduce aggregation and cell death caused by mutant huntingtin exon 1 by decreasing mTOR phosphorylation and inducing autophagy. *Hum Mol Genet* **12**, 985-994.
- Rechsteiner, M., Realini, C., and Ustrell, V. (2000) The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* **345**, 1-15.
- Regelmann, J., Schule, T., Josupeit, F. S., Horak, J., Rose, M., *et al.* (2003) Catabolite degradation of fructose-1,6-bisphosphatase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a genome-wide screen identifies eight novel GID genes and indicates the existence of two degradation pathways. *Mol Biol Cell* **14**, 1652-1663.
- Reynolds, E. S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**, 208-212.
- Rivett, A. J., and Knecht, E. (1993) Protein turnover: proteasome location. *Curr Biol* **3**, 127-129.
- Rivett, A. J., Palmer, A., and Knecht, E. (1992) Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. *J Histochem Cytochem* **40**, 1165-1172.
- Rodríguez-Navarro, J. A., Rodríguez, L., Casarejos, M. J., Solano, R. M., Gómez, A., *et al.* (2010) Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis* **39**, 423-438.
- Rosner, M., Siegel, N., Valli, A., Fuchs, C., and Hengstschlager, M. (2010) mTOR phosphorylated at Ser2448 binds to raptor and rictor. *Amino Acids* **38**, 223-228.
- Saeki, Y., Kudo, T., Sone, T., Kikuchi, Y., Yokosawa, H., *et al.* (2009) Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J* **28**, 359-371.

- Sakiyama, T., Musch, M. W., Ropeleski, M. J., Tsubouchi, H., and Chang, E. B. (2009) Glutamine increases autophagy under basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **136**, 924-932.
- Salvador, J. M., Mittelstadt, P. R., Belova, G. I., Fornace, A. J., Jr., and Ashwell, J. D. (2005) The autoimmune suppressor Gadd45 α inhibits the T cell alternative p38 activation pathway. *Nat Immunol* **6**, 396-402.
- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A. L., Nada, S., *et al.* (2010) Regulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* **141**, 290-303.
- Sandberg, M., and Borg, L. A. (2006) Intracellular degradation of insulin and crinophagy are maintained by nitric oxide and cyclo-oxygenase 2 activity in isolated pancreatic islets. *Biol Cell* **98**, 307-315.
- Sarkar, S., Davies, J. E., Huang, Z., Tunnacliffe, A., and Rubinsztein, D. C. (2007) Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J Biol Chem* **282**, 5641-5652.
- Sautin, Y. Y., Lu, M., Gaugler, A., Zhang, L., and Gluck, S. L. (2005) Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated effects of glucose on vacuolar H⁺-ATPase assembly, translocation, and acidification of intracellular compartments in renal epithelial cells. *Mol Cell Biol* **25**, 575-589.
- Schork, S. M., Bee, G., Thumm, M., and Wolf, D. H. (1994) Catabolite inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast is mediated by the proteasome. *FEBS Lett* **349**, 270-274.
- Sciarretta, S., Zhai, P., Shao, D., Maejima, Y., Robbins, J., *et al.* (2012) Rheb is a critical regulator of autophagy during myocardial ischemia: pathophysiological implications in obesity and metabolic syndrome. *Circulation* **125**, 1134-1146.
- Sengupta, A., Molkenin, J. D., and Yutzey, K. E. (2009) FoxO transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* **284**, 28319-28331.
- Shang, F., Deng, G., Liu, Q., Guo, W., Haas, A. L., *et al.* (2005) Lys6-modified ubiquitin inhibits ubiquitin-dependent protein degradation. *J Biol Chem* **280**, 20365-20374.
- Shaw, R. J., Bardeesy, N., Manning, B. D., Lopez, L., Kosmatka, M., *et al.* (2004a) The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell* **6**, 91-99.
- Shaw, R. J., Kosmatka, M., Bardeesy, N., Hurley, R. L., Witters, L. A., *et al.* (2004b) The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 3329-3335.
- Shi, Y., Tang, B., Yu, P. W., Hao, Y. X., Lei, X., *et al.* (2012) Autophagy protects against oxaliplatin-induced cell death via ER stress and ROS in Caco-2 cells. *PLoS One* **7**, e51076.

- Shieh, S. Y., Ikeda, M., Taya, Y., and Prives, C. (1997) DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* **91**, 325-334.
- Shimada, Y., Kobayashi, H., Kawagoe, S., Aoki, K., Kaneshiro, E., *et al.* (2011) Endoplasmic reticulum stress induces autophagy through activation of p38 MAPK in fibroblasts from Pompe disease patients carrying c.546G>T mutation. *Mol Genet Metab* **104**, 566-573.
- Short, J. D., Houston, K. D., Dere, R., Cai, S. L., Kim, J., *et al.* (2008) AMP-activated protein kinase signaling results in cytoplasmic sequestration of p27. *Cancer Res* **68**, 6496-6506.
- Singh, R., and Cuervo, A. M. (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* **13**, 495-504.
- Sivaprasad, U., and Basu, A. (2008) Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor- α -induced cell death in MCF-7 cells. *J Cell Mol Med* **12**, 1265-1271.
- Sledz, P., Unverdorben, P., Beck, F., Pfeifer, G., Schweitzer, A., *et al.* (2013) Structure of the 26S proteasome with ATP- γ S bound provides insights into the mechanism of nucleotide-dependent substrate translocation. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 7264-7269.
- Sobolewska, A., Gajewska, M., Zarzynska, J., Gajkowska, B., and Motyl, T. (2009) IGF-I, EGF, and sex steroids regulate autophagy in bovine mammary epithelial cells via the mTOR pathway. *Eur J Cell Biol* **88**, 117-130.
- Song, J. J., and Lee, Y. J. (2005) Cross-talk between JIP3 and JIP1 during glucose deprivation: SEK1-JNK2 and Akt1 act as mediators. *J Biol Chem* **280**, 26845-26855.
- Sorimachi, H., and Ono, Y. (2012) Regulation and physiological roles of the calpain system in muscular disorders. *Cardiovasc Res* **96**, 11-22.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., and Herman, P. K. (2009) The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 17049-17054.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., and Herman, P. K. (2010) The Tor and cAMP-dependent protein kinase signaling pathways coordinately control autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* **6**, 294-295.
- Suter, M., Riek, U., Tuerk, R., Schlattner, U., Wallimann, T., *et al.* (2006) Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem* **281**, 32207-32216.
- Suzuki, S. W., Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2011) Starvation induced cell death in autophagy-defective yeast mutants is caused by mitochondria dysfunction. *PLoS One* **6**, e17412.
- Suzuki, T., and Inoki, K. (2011) Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta Biochim Biophys Sin* **43**, 671-679.

- Taherbhoy, A. M., Tait, S. W., Kaiser, S. E., Williams, A. H., Deng, A., *et al.* (2011) Atg8 transfer from Atg7 to Atg3: a distinctive E1-E2 architecture and mechanism in the autophagy pathway. *Mol Cell* **44**, 451-461.
- Tait, S. W., de Vries, E., Maas, C., Keller, A. M., D'Santos, C. S., *et al.* (2007) Apoptosis induction by Bid requires unconventional ubiquitination and degradation of its N-terminal fragment. *J Cell Biol* **179**, 1453-1466.
- Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H. D., Sun, M., *et al.* (2007) Bif-1 interacts with Beclin1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* **9**, 1142-1151.
- Tan, J. M., Wong, E. S., Kirkpatrick, D. S., Pletnikova, O., Ko, H. S., *et al.* (2008) Lysine 63-linked ubiquitination promotes the formation and autophagic clearance of protein inclusions associated with neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **17**, 431-439.
- Tasdemir, E., Maiuri, M. C., Galluzzi, L., Vitale, I., Djavaheri-Mergny, M., *et al.* (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**, 676-687.
- Taylor, E. B., and Rutter, J. (2011) Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem Soc Trans* **39**, 1509-1513.
- Thompson, D., Hakala, K., and de Martino, G. N. (2009) Subcomplexes of PA700, the 19S regulator of the 26S proteasome, reveal relative roles of AAA subunits in 26S proteasome assembly and activation and ATPase activity. *J Biol Chem* **284**, 24891-24903.
- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C. M. (2000) Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J* **19**, 94-102.
- Thyagarajan, A., Jedinak, A., Nguyen, H., Terry, C., Baldrige, L. A., *et al.* (2010) Triterpenes from *Ganoderma Lucidum* induce autophagy in colon cancer through the inhibition of p38 mitogen-activated kinase (p38 MAPK). *Nutr Cancer* **62**, 630-640.
- Towler, M. C., and Hardie, D. G. (2007) AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* **100**, 328-341.
- Tsai, K. H., Wang, W. J., Lin, C. W., Pai, P., Lai, T. Y., *et al.* (2012) NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF- κ B in cardiomyocytes exposed to high glucose. *J Cell Physiol* **227**, 1347-1357.
- Tuttle, D. L., and Dunn, W. A., Jr. (1995) Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Cell Sci* **108**, 25-35.
- Vaccaro, M. I., Ropolo, A., Grasso, D., and Iovanna, J. L. (2008) A novel mammalian transmembrane protein reveals an alternative initiation pathway for autophagy. *Autophagy* **4**, 388-390.

- Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R. 3rd, *et al.* (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.
- Vernace, V. A., Arnaud, L., Schmidt-Glenewinkel, T., and Figueiredo-Pereira, M. E. (2007) Aging perturbs 26S proteasome assembly in *Drosophila melanogaster*. *FASEB J* **21**, 2672-2682.
- Viana, R., Aguado, C., Esteban, I., Moreno, D., Viollet, B., *et al.* (2008) Role of AMP-activated protein kinase in autophagy and proteasome function. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 964-968.
- Vidal-Donet, J. M., Carcel-Trullols, J., Casanova, B., Aguado, C., and Knecht, E. (2013) Alterations in ROS activity and lysosomal pH account for distinct patterns of macroautophagy in LINCL and JNCL fibroblasts. *PLoS One* **8**, e55526.
- Vucicevic, L., Misirkic, M., Janjetovic, K., Vilimanovich, U., Sudar, E., *et al.* (2011) Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway. *Autophagy* **7**, 40-50.
- Wang, J., Whiteman, M. W., Lian, H., Wang, G., Singh, A., *et al.* (2009) A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin1. *J Biol Chem* **284**, 21412-21424.
- Wang, Q., Liang, B., Shirwany, N. A., and Zou, M. H. (2011) 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One* **6**, e17234.
- Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A., and Roach, P. J. (2001) Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol Cell Biol* **21**, 5742-5752.
- Webber, J. L., and Tooze, S. A. (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38 α MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J* **29**, 27-40.
- Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008) JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* **30**, 678-688.
- Whitby, F. G., Masters, E. I., Kramer, L., Knowlton, J. R., Yao, Y., *et al.* (2000) Structural basis for the activation of 20S proteasomes by 11S regulators. *Nature* **408**, 115-120.
- Williams, T., Forsberg, L. J., Viollet, B., and Brenman, J. E. (2009) Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy* **5**, 1155-1165.
- Witczak, C., Fujii, N., Brandauer, J., Seifert, M., Nozaki, N., *et al.* (2006) CaMKK α activates AMPK signaling in mouse skeletal muscle in vivo. *FASEB J* **20**, A820.

- Witters, L. A., Kemp, B. E., and Means, A. R. (2006) Chutes and ladders: the search for protein kinases that act on AMPK. *Trends Biochem Sci* **31**, 13-16.
- Wolf, A., Beuerlein, K., Eckart, C., Weiser, H., Dickkopf, B., *et al.* (2011) Identification and functional characterization of novel phosphorylation sites in TAK1-binding protein (TAB) 1. *PLoS One* **6**, e29256.
- Wong, C. H., Iskandar, K. B., Yadav, S. K., Hirpara, J. L., Loh, T., *et al.* (2010) Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PLoS One* **5**, e9996.
- Wong, E., and Cuervo, A. M. (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a006734.
- Wood, C. D., Thornton, T. M., Sabio, G., Davis, R. A., and Rincon, M. (2009) Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int J Biol Sci* **5**, 428-437.
- Woods, A., Dickerson, K., Heath, R., Hong, S. P., Momcilovic, M., *et al.* (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase- β acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab* **2**, 21-33.
- Wu, W. K., Wu, Y. C., Yu, L., Li, Z. J., Sung, J. J., *et al.* (2008) Induction of autophagy by proteasome inhibitor is associated with proliferative arrest in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 258-263.
- Wu, Y. T., Tan, H. L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., *et al.* (2010) Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **285**, 10850-10861.
- Xavier, S., Gilbert, V., Rastaldi, M. P., Krick, S., Kollins, D., *et al.* (2010) BAMBI is expressed in endothelial cells and is regulated by lysosomal/autolysosomal degradation. *PLoS One* **5**, e12995.
- Xi, H., Barredo, J. C., Merchan, J. R., and Lampidis, T. J. (2013) Endoplasmic reticulum stress induced by 2-deoxyglucose but not glucose starvation activates AMPK through CaMKK β leading to autophagy. *Biochem Pharmacol* **85**, 1463-1477.
- Xi, H., Kurtoglu, M., Liu, H., Wangpaichitr, M., You, M., *et al.* (2011) 2-Deoxy-D-glucose activates autophagy via endoplasmic reticulum stress rather than ATP depletion. *Cancer Chemother Pharmacol* **67**, 899-910.
- Xu, J., Wang, S., Viollet, B., and Zou, M. H. (2012) Regulation of the proteasome by AMPK in endothelial cells: the role of O-GlcNAc transferase (OGT). *PLoS One* **7**, e36717.
- Xu, P., Duong, D. M., Seyfried, N. T., Cheng, D., Xie, Y., *et al.* (2009) Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation. *Cell* **137**, 133-145.

- Yan, J., Feng, Z., Liu, J., Shen, W., Wang, Y., *et al.* (2011) Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Nutr Biochem* **23**, 716-724.
- Yin, H., Gui, Y., Du, G., Frohman, M. A., and Zheng, X. L. (2010) Dependence of phospholipase D1 multi-monoubiquitination on its enzymatic activity and palmitoylation. *J Biol Chem* **285**, 13580-13588.
- Yoo, B. H., Wu, X., Li, Y., Haniff, M., Sasazuki, T., *et al.* (2010) Oncogenic ras-induced down-regulation of autophagy mediator Beclin-1 is required for malignant transformation of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **285**, 5438-5449.
- Younce, C. W., and Kolattukudy, P. E. (2010) MCP-1 causes cardiomyoblast death via autophagy resulting from ER stress caused by oxidative stress generated by inducing a novel zinc-finger protein, MCPIP. *Biochem J* **426**, 43-53.
- Yu, H. C., Hou, D. R., Liu, C. Y., Lin, C. S., Shiau, C. W., *et al.* (2013) Cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A mediates bortezomib-induced autophagy in hepatocellular carcinoma independent of proteasome. *PLoS One* **8**, e55705.
- Yu, T., Robotham, J. L., and Yoon, Y. (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 2653-2658.
- Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., *et al.* (2009) DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of Beclin1 promotes dissociation of Beclin1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep* **10**, 285-292.
- Zhan, Y., Gong, K., Chen, C., Wang, H., and Li, W. (2012) p38 MAP kinase functions as a switch in MS-275-induced reactive oxygen species-dependent autophagy and apoptosis in human colon cancer cells. *Free Radic Biol Med* **53**, 532-543.
- Zhang, F., Paterson, A. J., Huang, P., Wang, K., and Kudlow, J. E. (2007) Metabolic control of proteasome function. *Physiology* **22**, 373-379.
- Zhang, H., Chen, G. G., Zhang, Z., Chun, S., Leung, B. C., *et al.* (2012) Induction of autophagy in hepatocellular carcinoma cells by SB203580 requires activation of AMPK and DAPK but not p38 MAPK. *Apoptosis* **17**, 325-334.
- Zhao, Y., Xiong, X., and Sun, Y. (2011) DEPTOR, an mTOR inhibitor, is a physiological substrate of SCF(β TrCP) E3 ubiquitin ligase and regulates survival and autophagy. *Mol Cell* **44**, 304-316.
- Zhu, K., Dunner, K., Jr., and McConkey, D. J. (2010) Proteasome inhibitors activate autophagy as a cytoprotective response in human prostate cancer cells. *Oncogene* **29**, 451-462.

