

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.