



Universidad de Oviedo



Universidad de Oviedo

Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias

MÁSTER EN BIOMEDICINA Y ONCOLOGÍA MOLECULAR

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

ANÁLISIS DEL PROCESO DE AUTOFAGIA EN MODELOS CELULARES Y ANIMALES DEFICIENTES EN PROTEASAS DE LA FAMILIA ATG4

AUTOR: NEREA GONZÁLEZ MACÍAS
AUTOFAGIA Y METABOLISMO ISPA-FINBA
JULIO 2021

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar al Doctor Guillermo Mariño su apoyo y conocimientos durante todos estos meses de trabajo. También a María, a Isaac y a Álvaro, que han sido de gran ayuda en mi aprendizaje.

Me gustaría agradecer también a todas las personas de este máster que han hecho de Oviedo una ciudad mágica para vivir estos meses, en especial a vosotras, Paola, Carmen, Llara, Rebe y Belén.

Como no podía ser de otra manera, gracias Raquel por hacer de nosotras en ocho meses una amistad que me llevo para siempre. Y a ti Julia por sacarme mil sonrisas en los días buenos y no tan buenos.

A mis amigos de la Universidad de Salamanca y de Grijalba, que sin ellos nunca hubiese llegado a ser la persona que soy a día de hoy.

También quiero agradecer a mis tesoros Ángela, Ana, Sara y Ana su apoyo desde la distancia, gracias por estar siempre a mi lado.

Gracias Jose, mi bro, por todas las tardes de cerveza arreglando nuestros corazones...A Marcos por saber escucharme siempre y a Eneko por animarme en todo y quererme tan bien. Gracias también a ti, Esther, por inspirarme tanto como persona todos estos años.

A mis padres y mi hermano, que tanto me quieren y me apoyan en todo lo que hago, sois mi motor siempre. Y en especial a mi amama Juli, que sé que estaría muy orgullosa de mí.

Y finalmente gracias a ti Estela, mi mejor amiga y consejera, gracias por confiar en mí más que nadie y estar conmigo hasta el final.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS	2
INTRODUCCIÓN	3
TIPOS DE AUTOFAGIA EN EUCARIOTAS.....	3
GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA	5
MAQUINARIA MOLECULAR DE LA AUTOFAGIA	6
SISTEMA DE CONJUGACIÓN ATG4-ATG8	11
AUTOFAGINAS Y PATOLOGÍAS	14
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
1.CULTIVOS CELULARES.....	17
1.1 Cultivo de fibroblastos de oreja de ratón (AFs).....	17
1.2 Inmortalización de las células	18
1.3 Mantenimiento de las líneas celulares.....	19
1.4 Genotipado de las células	20
1.5 Inducción del flujo autofágico.....	21
1.6 Extracción de proteínas	22
1.7 Cuantificación proteica	23
1.8 Preparación de los extractos	25
1.9 Análisis de proteínas mediante Western-Blot	25
2. Flujo autofágico <i>in vivo</i>	27
2.1 Preparación de los tejidos para análisis mediante Western-Blot.....	29
RESULTADOS	29
1. Western-Blot	29
1.1. Análisis del flujo autofágico en los cultivos celulares mediante WB (WT Y atg4abd -/-).....	30
1.2 Análisis del flujo autofágico en tejidos mediante WB (ratones WT y atg4a -/-)	32
1.3 Análisis del flujo autofágico en tejidos mediante WB (ratones WT y atg4abd -/-) ..	34
2. Genotipado de las líneas celulares	37
DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXO I	45
ANEXO II.....	46

RESUMEN

La autofagia es un proceso catabólico presente en todas las células eucariotas en el que múltiples componentes citoplásmicos son entregados al lisosoma o vacuola por un orgánulo de doble membrana denominado autofagosoma. La autofagia se da a nivel basal en condiciones normales con el fin de mantener la homeostasis celular. Sin embargo, los niveles aumentan en condiciones estresantes, algo crucial para que los organismos se adapten a nuevas condiciones. Dentro de los genes implicados en la autofagia (genes ATG), el sistema Atg4-Atg8 es sustancial para que el proceso autofágico sea eficiente. A diferencia de otros genes ATG de levaduras en los que en mamíferos existe un único ortólogo, el sistema Atg4/Atg8 ha sufrido un aumento de complejidad a lo largo de la evolución, encontrándose varios ortólogos de los genes Atg4 y Atg8. Esto abre la posibilidad de una asociación de nuevas funciones, así como de una mayor complejidad necesaria para llevar a cabo la autofagia en los eucariotas superiores. En el presente trabajo se analiza el flujo autofágico en células de ratón cultivadas, caracterizando mediante Western- Blot el estado de las proteínas ATG8 (los posibles sustratos de las proteasas ATG4) en fibroblastos adultos de ratón que no presentaban los genes que codifican para ATG4B, ATG4C y ATG4D. Paralelamente, se estudia el flujo autofágico *in vivo* en modelos animales que son *Knock-out* para *atg4a* y para *atg4a*, *atg4b* y *atg4d*, expresando por tanto únicamente *Atg4c*. Los resultados obtenidos no muestran diferencias ni en el flujo autofágico ni en el procesamiento de los sustratos en ausencia de la proteasa ATG4A. Por el contrario, observamos que la presencia únicamente de la proteasa ATG4C es capaz de ejercer una actividad mínima frente a las proteínas ATG8, lo que permite un cierto flujo autofágico, pero que no es capaz de procesar eficientemente la mayoría de las proteínas ATG8.

Palabras clave: Autofagia, Atg4-Atg8, flujo autofágico, Atg4C, Atg4A, Western-Blot.

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	NOMBRE	ABREVIATURA	NOMBRE
AcNH4	Acetato de amonio	LC3/MAP-1	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
ADN	Ácido desoxirribonucleico	mTOR	Mammalian target of rapamycin
ATG	Autophagy related genes	NaOH	Hidróxido de sodio
BSA	Bovine serum albumin	NF	Nutrient Free
CAM	Chaperone-mediated autophagy	PAS	Preautophagosomal structure
CRISPR/Cas9	Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats	PBS	Phosphate Buffered Saline
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose	PCR	Polymerase Chain Reaction
DMSO	Dimetilsulfóxido	PE	Fosfatidiletanolamina
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution	PFA	Paraformaldehído
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
EtOH	Etanol	PE	Fosfatidiletanolamina
FBSi	Suero fetal bovino inactivado	PSG	Penicilina, Estreptomina y L-Glutamina
FIP200	FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa	PVDF	Polivinilidenedifluoride
GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	RPM	Revoluciones por minuto
GABARAPL1	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1	SDS	Sodium dodecyl sulfate
GABARAPL2	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 2	SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Hsc70	Heat shock cognate 70	ULK	unc-51 like autophagy activating kinase
KO	Knock out	VPS34	Phosphatidylinositol 3-kinase
LAMP-2A	Lysosome-associated membrane protein 2	WT	Wild type

INTRODUCCIÓN

El término de autofagia (del griego “auto”, uno mismo y “fagia”, comer) se empleaba ya en la década de 1960 haciendo referencia a un sistema de autoalimentación del cuerpo humano para sobrevivir en situaciones de privación de nutrientes. Más tarde, Christian de Duve, descubridor de los lisosomas y quien inició los primeros experimentos para demostrar bioquímicamente la participación de los lisosomas en el proceso de autofagia, definió la autofagia como el mecanismo celular a través del cual los materiales intracelulares se entregan al lisosoma o vacuola para su degradación (1). Estudios posteriores describieron que la autofagia es un sistema de reciclaje dinámico de múltiples componentes citoplásmicos durante condiciones fisiológicas normales y en respuesta a diferentes tipos de estrés, como el ayuno, que produce nuevos bloques de construcción y energía para la renovación celular y la homeostasis (2).

TIPOS DE AUTOFAGIA EN EUCARIOTAS

Las células eucariotas tienen dos sistemas de degradación principales, el lisosoma y el proteasoma. La degradación proteasomal tiene una alta selectividad por los sustratos ubiquitinados, mientras que la degradación lisosomal degrada tanto material extracelular endocitado por la célula como componentes citosólicos y orgánulos transportados hasta el lisosoma por autofagia (2).

La autofagia es un proceso catabólico altamente conservado en eucariotas, desde levaduras a mamíferos. Existen al menos tres formas distintas de autofagia: la microautofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA) y la macroautofagia; difiriendo principalmente en la forma por la cual se entrega la carga citosólica al lisosoma (3).

- ✚ La **microautofagia** hace referencia al secuestro de componentes citosólicos directamente por los lisosomas a través de invaginaciones en su membrana. La captación se produce directamente en la membrana limitante del lisosoma y puede incluir orgánulos intactos. Debido al número limitado de herramientas disponibles para el estudio de este proceso, es escaso el conocimiento acerca de su regulación, así como papel en la salud y enfermedad en el ser humano. Esto se debe principalmente a la dificultad de observar invaginaciones de membrana en los

pequeños lisosomas de células de mamíferos junto con la falta de ensayos concluyentes para medir específicamente la tasa de microautofagia (Figura 1) (4).

- ✚ La **CMA** fue el primer proceso estudiado que indicó que la degradación de los componentes intracelulares por el lisosoma puede ser selectivo. Esta selectividad se demostró posteriormente para otras formas de autofagia. La CMA implica la translocación directa de las proteínas a degradar a través de la membrana del lisosoma mediante la acción de una chaperona citosólica y lisosomal, la HSC70, que reconoce las proteínas sustrato que contienen un pentapéptido con una secuencia similar a KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) (5).

Las chaperonas conducen las proteínas a degradar hasta el lisosoma donde son translocadas hacia el lumen por medio del receptor LAMP-2 (proteína de membrana asociada al lisosoma tipo 2A) (5).

Los niveles basales de CMA difieren ampliamente entre los tipos de células y tejidos y se induce en respuesta a una gran variedad de factores estresantes, como el ayuno, el estrés oxidativo, las agresiones genotóxicas, la hipoxia y la radiación (6) (Figura 1).

- ✚ La **macroautofagia** (referida como autofagia a lo largo del trabajo) es el principal mecanismo catabólico regulado que utilizan las células eucariotas para degradar proteínas y orgánulos.

En esta forma de autofagia las partes de citoplasma se secuestran dentro de una vesícula de doble membrana, el autofagosoma, para entregarla al lisosoma. Este proceso está mediado por un conjunto de genes evolutivamente conservados, los ATG, de los cuales se hablará más adelante.

El secuestro puede ser inespecífico, con la incorporación del citoplasma directamente, o selectivo, degradándose de forma específica orgánulos, agregados proteicos o microorganismos invasores (5).

La autofagia requiere de la formación inicial “de novo” de un fagóforo o membrana de aislamiento, que posteriormente se alarga a través de mecanismos poco conocidos actualmente, formando una membrana limitante. La membrana limitante secuestra porciones del citoplasma destinadas a su degradación y se

sella sobre sí misma para formar el autofagosoma, la vesícula de doble membrana (5).

El autofagosoma carece de enzimas requeridas para la digestión de su contenido, por ello, la degradación del contenido se da por fusión del autofagosoma con el lisosoma o vacuola (esta última en caso de levaduras y plantas), resultando en el autolisosoma. En el autolisosoma tanto el contenido citoplásmico como la membrana interna se degradan por las hidrolasas lisosomales. Los metabolitos resultantes se transportan al citoplasma mediante permeasas de membrana y se emplean para la síntesis de nuevas macromoléculas o como fuente de energía (5,7) (Figura 1).

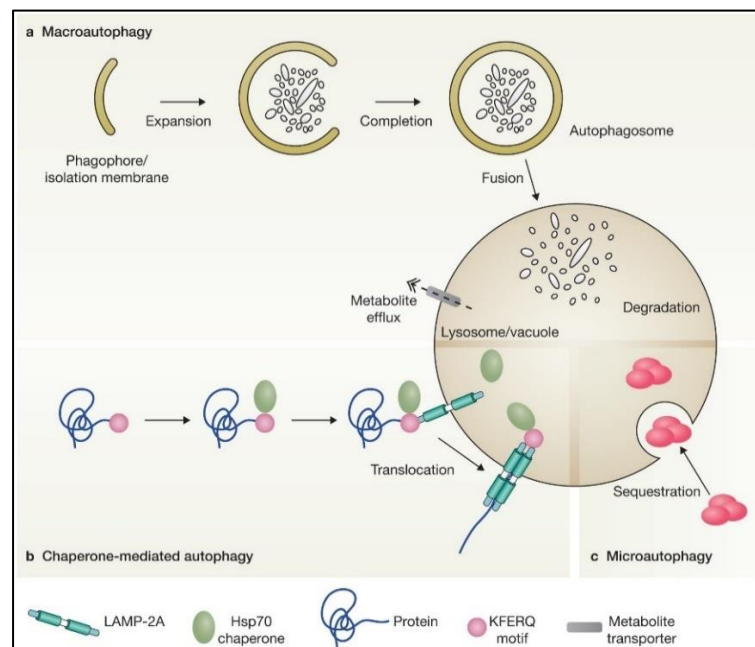


Figura 1. Representación de los diferentes tipos de autofagia. A) Formación del autofagosoma y fusión con el lisosoma en la macroautofagia. B) Translocación del sustrato al lumen del lisosoma por medio de chaperonas en la CMA. C) Secuestro de componentes citosólicos directamente al lisosoma en la microautofagia (8).

GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA

Durante los años 1960-1990 se publicaron extensos artículos sobre la regulación de la autofagia por privación de aminoácidos y factores de crecimiento, así como descripciones detalladas de la morfología ultraestructural de las estructuras relacionadas con la

autofagia. Sin embargo, las moléculas que participaban específicamente en los procesos de autofagia seguían sin ser identificadas. No fue hasta los años 90 cuando el científico Yoshinori Ohsumi descubrió los genes de la autofagia en levaduras y, junto con los numerosos descubrimientos en los mecanismos de la autofagia, le otorgaron un Premio Nobel de Medicina en el 2016 (9).

El laboratorio de Yoshinori Ohsumi aisló 15 mutantes de levadura (mutantes *apg*) que eran defectuosos en la macroautofagia. Esto llevó al descubrimiento de una serie de genes relacionados con la autofagia denominados APG (10). Los descubrimientos de otros genes APG (Anexo 1, 11) por parte de otros grupos de investigación hicieron aumentar la lista de Yoshinori Ohsumi y más adelante, en 2003, la nomenclatura de estos genes se unificó bajo el nombre de "**genes relacionados con la autofagia (ATG)**", Hasta la fecha, se han identificado 42 genes ATG. De ellos, dieciséis se han clasificado como genes ATG "centrales", los cuales se utilizan comúnmente tanto por la macroautofagia no selectiva como por la selectiva. El resto son genes exclusivos de tipos específicos de autofagia selectiva (por ejemplo, la autofagia mitocondrial denominada mitofagia). Los genes ATG están muy conservados entre los eucariotas y, en consecuencia, han surgido como un aspecto central en el estudio de la macroautofagia en muchos otros organismos (1)

MAQUINARIA MOLECULAR DE LA AUTOFAGIA

El proceso de autofagia se divide en diversos pasos mecánicamente distintos, que incluyen inducción, reconocimiento y selección de la carga, formación y transporte de los autofagosomas, fusión autofagoma-lisosoma y descomposición de la carga citosólica seguida de la liberación de los productos de degradación al citosol. Diferentes conjuntos de proteínas ATG están involucrados en estos pasos conformando la maquinaria autofágica central (12).

- 1. Inducción:** La autofagia a nivel basal es baja en condiciones normales; por ello, un mecanismo eficiente para inducir la autofagia es crucial para que los organismos se adapten al estrés y las señales extracelulares. Cuando se da una situación de estrés como la falta de alimento, de factores de crecimiento, infecciones, estrés oxidativo o hipoxia, los niveles de autofagia incrementan para así sobrevivir ante estas situaciones desfavorables para la célula (13).

El mecanismo de la autofagia inducida por la bajada de aminoácidos es el mejor caracterizado. En estas condiciones, la autofagia se inicia rápidamente con el fin de promover el recambio proteico y de orgánulos intracelulares; de esta forma se proporcionan aminoácidos para mantener la síntesis de proteínas esenciales para la supervivencia (se desencadena un tipo de autofagia no selectivo). Un regulador maestro de la autofagia en respuesta a la disponibilidad de nutrientes es el complejo mTORC1 (diana de la rapamicina), una proteína serina/treonina quinasa. Esta quinasa favorece el catabolismo o anabolismo en función de las condiciones energéticas en las que se encuentre la célula (13).

En levaduras y *Drosophila*, Tor/ dTOR integra información de entrada de múltiples vías de transducción de señales ascendentes y regula negativamente otra serina / treonina quinasa, la Atg1, en condiciones ricas en nutrientes. En las levaduras, cuando Tor está inhibido por el ayuno o por tratamiento con rapamicina, la actividad quinasa de Atg1 se activa y la afinidad de unión de Atg1 a Atg13 y Atg17 aumenta, promoviendo la formación del complejo Atg1-Atg13-Atg17 y el reclutamiento de múltiples proteínas ATG a la estructura pre-autofagosomal (PAS) para iniciar la formación de autofagosomas. En resumen, el papel del complejo Atg1 en el reclutamiento de proteínas es indispensable para la inducción de la autofagia de levaduras (13,14).

En mamíferos hay dos homólogos de Atg1 que parecen funcionar en la autofagia, la quinasa 1 similar a Unc-51 (ULK1) y -2 (ULK2), y un homólogo de la proteína de levadura Atg17, FIP200, que forma un complejo con ULK, Atg13 y ATG101 y se localiza en el fagóforo. Los sustratos Atg13 y FIP200 son fosforilados por las ULKs, que también experimentan autofosforilación, conduciendo a un cambio conformacional e inducción de autofagia. La quinasa mTORC1 fosforila e inactiva a las ULKs y Atg13 en condiciones ricas en nutrientes. Por el contrario, cuando mTORC1 se inhibe por ayuno o rapamicina, ULK1 y ULK2 se activan y fosforilan Atg13 y FIP200, que son esenciales para la actividad de autofagia. TG101 también es esencial para la autofagia e interactúa con el complejo ULK1 mediante la unión directa a ATG13 (Figura 2) (15).

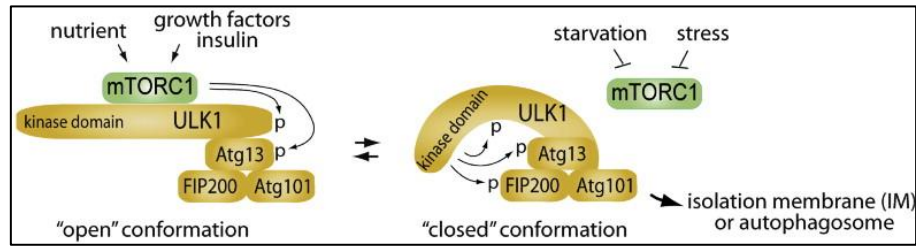


Figura 2. Regulación de la autofagia por mTORC1(15).

2. Reconocimiento y selectividad de carga

En la autofagia selectiva, la carga citoplásmica se reconoce a través de interacciones con proteínas receptoras específicas. En los organismos multicelulares, la autofagia juega un papel importante en el aclaramiento de sustratos citosólicos que han sido ubiquitinados o de proteínas que tienen predisposición a agregarse. Este proceso catabólico selectivo está mediado a través de la proteína de mamífero p62 / sequestosoma 1 (SQSTM1). p62 se une directamente a la poli/monoubiquitina por medio de su dominio asociado a ubiquitina (UBA) y el homólogo de ATG8 de mamífero, LC3/GABARAP, vinculando las cargas citosólicas ubiquitinadas con la maquinaria de autofagia para la degradación autofágica (13).

3. Formación de los autophosomas

La formación de los autophosomas es uno de los pasos más complejos de la autofagia y requiere de una coordinación altamente regulada de las proteínas ATG.

La nucleación y ensamblaje de la membrana del fagóforo inicial requiere de la proteína Atg9 y del complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III. Un miembro de esta familia de quinasas, Vsp34, es la única PI3-quinasa identificada en levaduras y se ha conservado evolutivamente a través de mamíferos. Este complejo está compuesto, junto con Vsp34, por Vps15 (p150 en células de mamíferos), Atg14 (Barkor o mAtg14 en células de mamíferos) y Atg6 / Vps30 (BECLIN 1 en células de mamíferos). La función de BECLIN 1 en la autofagia está regulada por BCL-2 (linfoma de células B / leucemia-2), una proteína antiapoptótica que inhibe la autofagia al unirse y secuestrar BECLIN 1 en

condiciones ricas en nutrientes, por el contrario, BCL-2 se disocia de BCL-1 y se induce la autofagia (Figura 3) (16). En relación con esto último, se ha visto que la interrupción del complejo BECLIN 1 – BCL-2 es un mecanismo eficaz para aumentar la autofagia, prevenir el envejecimiento prematuro, mejorar la salud y promover la longevidad en los mamíferos (17).

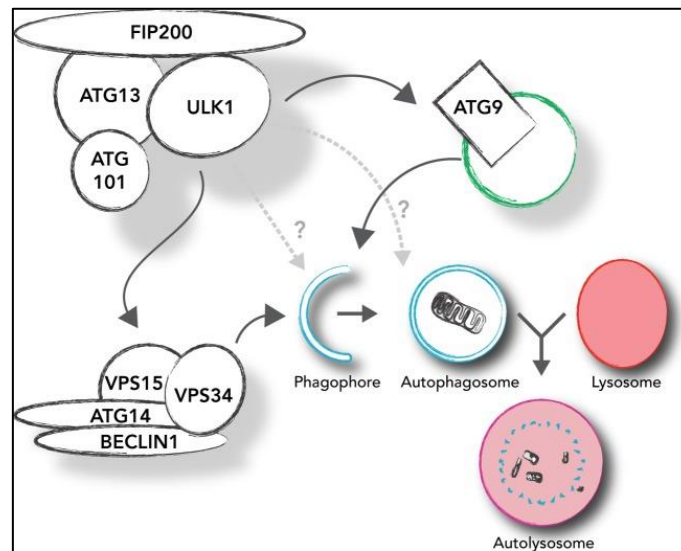


Figura 3. Papel de ULK-1 en la inducción de la autofagia mediante la activación de Atg9 y del complejo VPS34 (16).

En las levaduras, el complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III produce fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) y participa en la selección para la estructura pre-autofagosomal de varias proteínas ATG de levadura que se unen al PI3P, como Atg18, Atg20, Atg21 y Atg24. En la levadura, Atg20 y Atg24 interactúan con el complejo Atg1-Atg13-Atg17, mediando la inducción de la autofagia. El complejo de fosfatidilinositol 3-quinasa de clase III junto con las proteínas ATG anteriores, recluta al fagóforo dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina (UBL) interrelacionados, Atg12-Atg5-Atg16 y Atg8-PE. Estos sistemas juegan un papel esencial en la regulación del alargamiento y expansión de la membrana del autofosoma en formación, funcionan tanto en la autofagia selectiva como en la no selectiva y están muy conservados evolutivamente (13).

Tanto Atg12 como Atg8 se conjugan de forma similar a la ubiquitina:

- **Atg12:** se activa inicialmente por Atg7 (enzima activadora de E1), después se transfiere a Atg10 (enzima conjugadora de E2) y finalmente se une covalentemente a una lisina interna de la proteína Atg5. El conjugado Atg12-Atg5 interactúa con una proteína Atg16 para formar el complejo Atg12-Atg5-Atg16 y se une al fagóforo. Este complejo Atg12-Atg5-Atg16 se localiza principalmente en el lado externo del fagóforo (Figura 4) (13).

- **Atg8:** en levaduras Atg8 se sintetiza como una proteína soluble inactiva y necesita ser procesada postraduccionalmente para unirse covalentemente a una molécula de fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana preautofagosomal (18). A diferencia del conjugado Atg12-Atg5, la conjugación Atg8-PE es un proceso reversible.

El proceso de activación se inicia con la escisión de su región C-terminal por la cisteína proteasa Atg4, exponiendo un residuo de glicina esencial para las posteriores interacciones. El extremo C-terminal de Atg8 se adenila en una reacción dependiente de ATP por la enzima E1, Atg7, formando un intermediario tioéster Atg8-Atg7 que se transfiere a la enzima E2 (Atg3). Por último, Atg8 se conjuga con el lípido fosfatidiletanolamina (PE) donde el resto carboxilo C-terminal de Atg8 se une covalentemente al grupo amina de PE (enlace amida). Este paso está facilitado por el conjugado Atg12-Atg5-Atg16 similar a E3 (Figura 4) (13).

En condiciones ricas en nutrientes, la mayoría de Atg8 es citosólico. Sin embargo, tras la inducción de la autofagia, Atg8 está de forma conjugada con lípidos y se localiza a ambos lados del fagóforo. El complejo Atg8-PE interviene, al menos, en dos funciones. Por un lado, participa en el alargamiento del fagóforo o membrana de aislamiento y también tiene un papel importante en el reconocimiento de cargas selectivas a través de receptores/adaptadores de carga. La lipidación con PE se emplea para monitorizar la inducción de la autofagia (18).

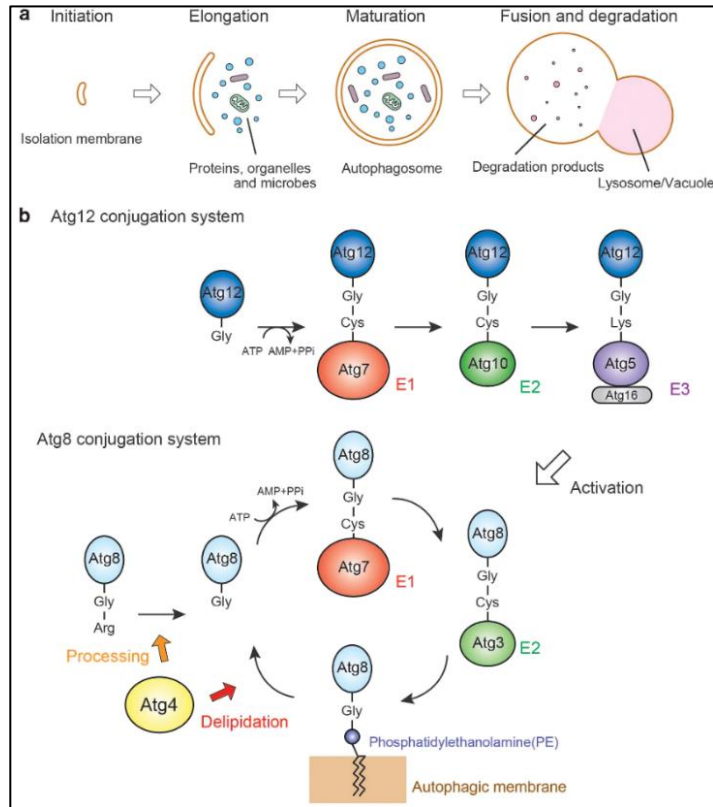


Figura 4. Mecanismo molecular de la autofagia. A) Formación del autofagosoma. B) Sistemas de conjugación Atg12 y Atg8 (18).

4. Fusión de vesículas y ruptura de autofagosomas

Una vez completada la formación del autofagosoma, el Atg8 que está adherido a la membrana externa es escindido de PE por Atg4 (rompe el enlace amida) y liberado de nuevo al citosol. Esta liberación de Atg8 de los autofagosomas maduros facilita la fusión de estas estructuras con los lisosomas.

Finalmente, la degradación de la vesícula interna depende de una serie de hidrolasas ácidas lisosomales / vacuolares y el contenido regresa al citoplasma por medio de permeasas vacuolares como Atg22 (13).

SISTEMA DE CONJUGACIÓN ATG4-ATG8

La proteína Atg4 se identificó inicialmente en levaduras como la única cisteín proteasa específica de Atg8. Esta cisteín proteasa es necesaria para la activación de la proteína Atg8 inmadura, escindiendo su región C-terminal y exponiendo un residuo de glicina

(GLY116) esencial para su unión al fagóforo. Además, Atg4 también es responsable de la recuperación de Atg8 a través de la delipidación de Atg8 de los autofagosomas maduros y de otras membranas a los que se une por error (Figura 5) (19). Dado que tanto la reacción de procesamiento como la de delipidación son importantes para la formación de los autofagosomas, la inhibición de esta proteasa conduce a la inhibición de la autofagia en la formación de los autofagosomas; por tanto, es de especial interés para el desarrollo de inhibidores autofágicos (19).

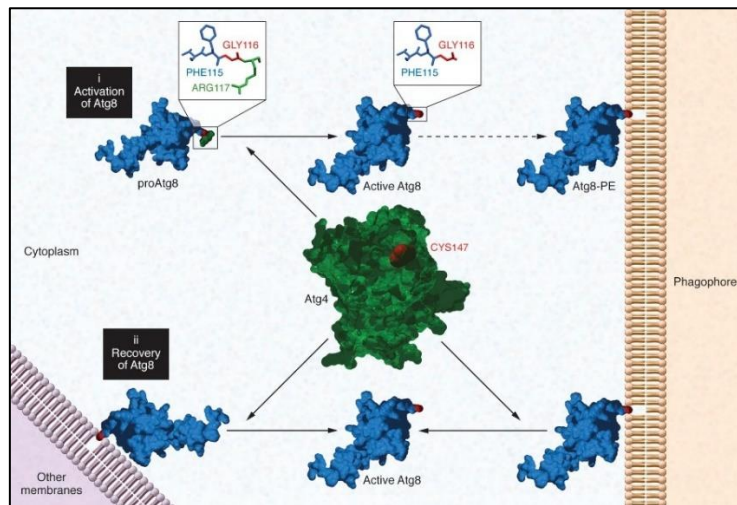


Figura 5. Sistema de conjugación Atg4-Atg8 (19).

Tanto Atg4 como Atg8 están conservados evolutivamente de levaduras a mamíferos. Las levaduras tienen un único gen Atg4 y Atg8; mientras que los eucariotas superiores conservan múltiples homólogos para ambas proteínas (Figura 6). En mamíferos se conocen cuatro ortólogos de Atg4: ATG4A/Autofagina-2, ATGB/Autofagina-1, ATGC/Autofagina-3, ATG4D/Autofagina-4. La secuenciación de los genes que codifican estos ortólogos pone de manifiesto la divergencia evolutiva de este gen en dos subfamilias concretas: ATG4A/ATG4B Y ATG4C/ATG4D (Figura 6) (20). En el caso de Atg8 hay seis ortólogos que se agrupan en dos subfamilias: la proteína 1-cadena ligera 3 asociada a microtúbulos (MAP1-LC3) que incluye LC3A, LC3B, LC3C, este último en humanos y GABARAP (GABARAP, GABARAPL1 y GABARAPL2/ GATE16). La mayor parte de la comprensión actual sobre los homólogos humanos de Atg8 proviene de la proteína LC3B, y la mayoría de sus propiedades moleculares se extrapolan a la subfamilia en su conjunto (20). Las subfamilias de LC3 y GABARAP difieren tanto en las características estructurales como en el papel funcional en la formación del autofagosoma. Actualmente

se conoce que actúan diferente en las primeras etapas de la biogénesis de autofagosomas: los LC3 están involucrados en el alargamiento de la membrana del fagóforo mientras que la familia GABARAP / GATE-16 es esencial para una etapa posterior en la maduración del autofagosoma (21).

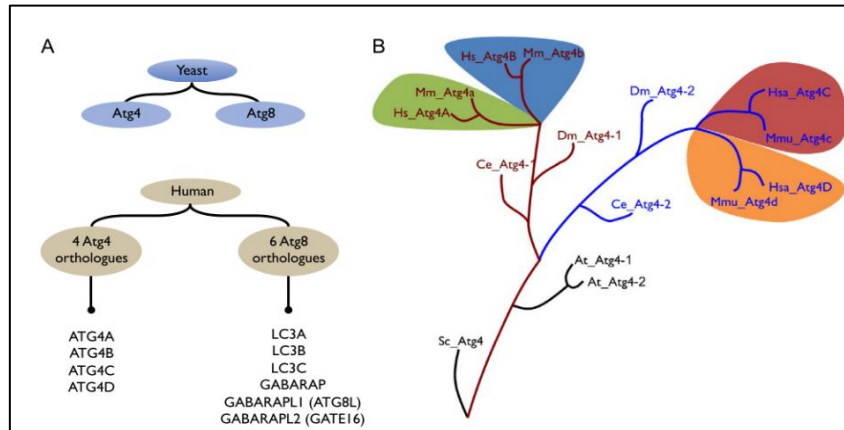


Figura 6. Incremento de la complejidad en el sistema Atg4-Atg8 a lo largo de la evolución. (A) Comparativa entre Atg4 y Atg8 entre levaduras y eucariotas más complejas (B) Representación de la amplificación del gen Atg4 a lo largo de la evolución (Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; At, *Arabidopsis thaliana*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Mm, *Mus musculus*; Hs, *Homo sapiens*) (20).

La actividad de cada proteasa ATG4 es diferente entre los ortólogos de ATG4 y la susceptibilidad a cada ortólogo de ATG4 también es diferente entre los ortólogos de ATG8. Pese a que la eficiencia catalítica de los ortólogos de ATG4 frente a los de ATG8 sea muy diferente, su afinidad de unión es similar (21).

Es importante caracterizar la especificidad proteasa-sustrato para comprender las funciones específicas y más generales desempeñadas por las proteasas ATG4 de mamíferos y sus sustratos. Recientemente, varios estudios han elucidado acerca de esta especificidad al analizar la actividad de proteasas de ATG4 recombinantes hacia algunos de los sustratos de ATG8 de mamíferos *in vitro*. Se ha descrito que ATGB es la enzima con mayor espectro, capaz de procesar la mayoría de los sustratos Atg8 en humanos con gran afinidad y eficiencia catalítica, por ejemplo, tiene capacidad de eficiencia de procesamiento de LC3B 1500 veces mayor que los otros ortólogos de ATG4; Atg4A es la segunda enzima más potente, siendo una proteasa eficaz frente a GABARAP L2, aunque es incapaz de escindir LC3B. Al comparar la estructura del centro catalítico de ATG4A frente a ATG4B se observan similitudes en la tríada catalítica (21). Los

aminoácidos que interactúan con LC3B en ATG4B también se encuentran en ATG4A, con la excepción de que en este último Leu232 se ve sustituido por Ile233 (22). De hecho, se ha comprobado que la mutación Leu 232 en Ile233 mejora la actividad de ATG4A hacia LC3 (18). ATG4C y ATG4D tienen capacidad de unirse de manera eficiente a los sustratos, pero muestran una actividad catalítica reducida contra ellos, ya que solo pueden procesar LC3B y GABARAPL2 (probablemente porque la tríada catalítica tenga una posición que dificulte el acceso de estos sustratos). Tanto ATG4D como ATG4C presentan sitios de escisión por caspasas, indicando una posible coordinación entre procesos apoptóticos y autofágicos en la célula (22).

Este sistema ATG4-ATG8 ha adquirido una complejidad notable a lo largo de la evolución, sugiriendo que el proceso de autofagia además de ser importante para la salud celular y tisular, presenta nuevas funciones que están siendo cada vez más estudiadas. Por ello, analizar el reconocimiento de los sustratos o las interacciones entre estas proteínas, sería de especial interés para comprender y aislar funciones del proceso (20).

AUTOFAGINAS Y PATOLOGÍAS

Dada la amplia diversidad de ortólogos y actividades descritas en el sistema ATG8 de mamíferos, se ha propuesto la hipótesis de que las proteasas ATG4 pueden estar implicadas en diferentes procesos fisiológicos.

Los ratones *Knock-out* han sido herramientas de investigación con importantes limitaciones para los estudios globales *in vivo* realizado sobre autofagia, ya que proteínas como Atg5, Atg3 o Atg7 son esenciales para la viabilidad de los ratones. Sin embargo, la aparente redundancia funcional de la familia ATG4 ha hecho posible la generación de ratones deficientes en ATG4, que presentan un flujo autofágico alterado, pero son viables. Esto hace que estos ratones sean unos excelentes modelos para evaluar las funciones *in vivo* de la autofagia (19).

La bibliografía actual describe que los ratones deficientes en ATG4C sometidos a periodos prolongados de ayuno necesitan de ATG4C para que se dé una activación máxima de la autofagia en tejidos que dependen del consumo continuo de energía, como el diafragma. Además, estos ratones *atg4c* *-/-* son más susceptibles a desarrollar fibrosarcomas inducidos por carcinógenos químicos debido a la disminución de la actividad autofágica inducida por este estrés genotóxico (22). En el caso de los ratones

deficientes de ATG4B se da una secreción alterada y un ensamblaje de componentes otoconiales en las regiones vestibulares del oído interno, conduciendo a trastornos del equilibrio (23). Además, estos ratones deficientes en ATG4B muestran alteraciones en la secreción de proteínas tanto en las células de Paneth como la resorción ósea por los osteoclastos, apuntando a una función de la autofagia en las células secretoras (24).

Además, estudios en células epiteliales inmortalizadas deficientes en ATG4 indican que la maquinaria autofágica puede limitar el daño del ADN y la inestabilidad cromosómica (25). Se ha demostrado que p53 puede unirse y regular *ATG4A* y *ATG4C* (entre otros varios genes ATG como *Atg7*, *Atg10*, *Ulk1* y *Ulk2*) en respuesta al daño del ADN, induciendo una respuesta autofágica que podría contribuir a la supresión tumoral, mejorando la apoptosis dependiente de p53 (25).

En cuanto a la relevancia de las proteasas ATG4 en el cáncer, se han encontrado diferentes alteraciones estructurales en los genes que codifican estas enzimas en varias neoplasias malignas, siendo el gen *ATG4D* el más mutado seguido de *ATG4B* y *ATG4C* (19). No obstante, pese a la evidencia genética actual sobre las autofaginas, se sabe poco sobre las funciones específicas de estas proteasas autofágicas en la progresión del cáncer. Por ello, se necesitan más estudios *in vivo* con más modelos deficientes en ATG4, especialmente para explicar el papel dual de la autofagia en el cáncer, ya sea promoviendo la supervivencia de las células cancerosas (usan la maquinaria de la autofagia para obtener nutrientes) o suprimiendo la tumorigénesis manteniendo la homeostasis celular (por ejemplo, el papel de las ATG4 como posibles genes supresores de tumores) (26).

También se ha observado una función alterada de ATG4 en las enfermedades inflamatorias intestinales (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn) ya que una autofagia interrumpida resulta en un procesamiento deficiente de los componentes bacterianos, desencadenando las respuestas inflamatorias exacerbadas que caracterizan estos trastornos intestinales (19).

Las proteasas ATG4 (especialmente ATG4B y ATG4D) también se han visto implicadas en la patogénesis de enfermedades infecciosas causadas por virus y parásitos, ya que se sabe que emplean la autofagia para su supervivencia, diferenciación y virulencia. Por ello, una intervención terapéutica a este nivel podría bloquear o ralentizar la infección (19).

Finalmente, la evidencia acumulada durante la última década indica que la autofagia también tiene un papel directo en la modulación del envejecimiento. El envejecimiento es un fenómeno biológico caracterizado a nivel celular por una acumulación progresiva de proteínas disfuncionales y orgánulos dañados. Esta acumulación da como resultado la interrupción de la homeostasis celular, la degeneración progresiva y aumenta el riesgo de muerte celular (27). En relación con esto, se ha descrito en varios organismos modelo una disminución natural en la función autofágica en varios órganos y tejidos específicos con la edad. Probablemente esta pérdida degenerativa de la actividad autofágica en las células envejecidas limite la capacidad de la célula para mantener una población de proteínas y orgánulos saludables con el paso del tiempo, contribuyendo a una pérdida progresiva de la función celular y finalmente llevando a la muerte celular (28).

Pese a que se está investigando cada vez más el papel de las autofaginas en un contexto fisiopatológico, se necesita enriquecer el campo con más estudios concluyentes para definir los determinantes precisos de la autofagia en la salud y en la enfermedad, ya que es un tema en auge con gran potencialidad en el ámbito biomédico.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

El objetivo de este trabajo de fin de máster realizar una caracterización funcional de las proteasas de la familia ATG4 (autofaginas), con especial interés en ATG4A y ATG4C, a partir de cultivos *in vitro* de fibroblastos adultos (AFs) de ratón y estudiar el flujo autofágico en ausencia de ATG4A, por un lado y de ATG4A, ATG4B Y ATGD simultáneamente, por otro. Para ello, se cuenta con líneas celulares *Wild Type* (WT) que presentan todas las autofaginas y líneas que son triples *Knock-out* (TKO) para las autofaginas ATG4A, ATGB y ATG4D; es decir, que únicamente presentan ATG4C. Estas células triples *Knock-out*, procedentes de organismos modificados genéticamente de la Universidad de Oviedo, facilitarán la comprensión acerca de las funciones que puede desempeñar ATG4C cuando es la única proteasa expresada.

Además, con el fin de reforzar estos resultados, se pretende estudiar el flujo *in vivo* en modelos animales que son *Knock-out* para ATG4A y ratones que únicamente poseen ATG4C, comparándolo con ratones que presentan todas las autofaginas (WT). La disponibilidad de estos modelos animales proporciona la posibilidad de analizar las

consecuencias de la ausencia de ATG4A y de la única presencia de ATG4C ante los distintos ortólogos de ATG8 *in vivo*, en ratones de laboratorio.

En lo que respecta a las líneas celulares WT, se espera que los sustratos de las subfamilias MAP1/LC3 y GABARAP sean procesados correctamente, permitiendo la formación de autofagosomas y un correcto desarrollo del proceso de autofagia. Por otro lado, de la línea TKO se deben tener una serie de consideraciones. La bibliografía actual describe que tanto ATG4B como ATG4A son las proteasas que tienen capacidad para procesar los sustratos ATG8 (especialmente LC3B y GABARAP-L2 respectivamente); siendo ATG4C y ATG4D menos eficientes en cuanto a su actividad catalítica (21). Por ello, se espera que haya una baja efectividad del procesamiento de los sustratos del subgrupo MAP1-LC3 y GABARAP en estas líneas. Además, se ha descrito recientemente que Atg4D es la principal enzima delipidante de los ATG8 de mamíferos; por lo que en estas células TKO se espera un acúmulo de estos en su forma unida a la membrana (29).

En cuanto a los modelos animales, el especial interés en el estudio de los ratones mutantes para ATG4A se debe a que, así como para las otras autofaginas sí que se han publicado diferentes artículos que muestran su papel funcional en modelos animales, en ATG4A apenas existen estudios claros que muestren actividad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

1.1 Cultivo de fibroblastos de oreja de ratón (AFs).

El trabajo experimental se ha realizado con células inmortalizadas de fibroblastos adultos procedentes de oreja de ratón (iAFs). Las orejas de ratones recientemente sacrificados se esterilizaron con etanol 70%, se enjuagaron en PBS y se cortaron en pequeñas secciones (10 mm) con tijeras esterilizadas. Después se trocearon con un bisturí desechable hasta que quedó una mezcla densa. Las orejas se incubaron con una mezcla de 500 µl de 4mg de colagenasa (Roche Applied Science) y 4mg de dispasa (Roche Applied Science) por un mililitro de DMEM (únicamente DMEM, sin ninguna adición) durante 45 minutos en una incubadora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente se le añadió 5 ml de DMEM+ 10% de suero fetal bovino (FBS)+ 1X de antibiótico antimicótico y se dejó incubando toda la

noche. Al día siguiente, la mezcla se filtró mediante filtros específicos de 100 μm de tamaño de poro y se centrifugó 5 minutos a 1200 rpm. El pellet se resuspendió en 1mL de medio de cultivo y se plaqueó en una placa de 12 pocillos. Pasados uno o dos días las células comenzaron a adherirse y crecer. Al segundo día se retiró el sobrenadante y se añadió medio de cultivo nuevo. Cuando la placa estuvo completamente confluyente, se tripsinizó y se pasó todo a un solo pocillo de una placa de 6 pocillos (pase I). Las células se expandieron y congelaron a distintos pases.

El medio de cultivo usado para las células es el Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM- GIBCO 414965-039) suplementado con: 10% de suero fetal bovino (GIBCO 10270-106), 1X de aminoácidos no esenciales (GIBCO11150-035), 10 mM de buffer HEPES (GIBCO 15630-056), 2X de Penicilina- Estreptomina- Glutamina (GIBCO 10378-016), 1X de antibiótico antimicótico (GIBCO 15240-062), 66 μM de 2-Mercaptoetanol (GIBCO 31350-010) y 1mM de piruvato de sodio (GIBCO 11360-039).

1.2 Inmortalización de las células

La inmortalización de células primarias es un proceso de múltiples etapas con la finalidad de inactivar genes que regulen negativamente la progresión del ciclo celular, en consecuencia, las células adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente. Para ello, se generan virus que porten oncogenes y posteriormente se realiza la transducción de las células primarias con dichos virus. En estas células se han inactivado genes que inhiben la acción de los supresores tumorales p53 y Rb. El gen codificante del antígeno T grande del virus SV40 es el que se ha empleado para inmortalizar estas células; como resultado se activa la transcripción mediada por E2F mediante la disgregación de los complejos Rb-E2F (la interacción de Rb con los factores de transcripción E2F inhibe la transcripción de genes que codifican proteínas necesarias para la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular) y se inhibe p53. En consecuencia, no va a haber arresto en el crecimiento, y la proliferación va a estar inducida por la eliminación del efecto represivo de Rb sobre E2F. Las células fueron transfectadas con el plásmido pBABE-puro SV40 LT (Addgene Plasmid Cat#13970), con un marcador de selección: un gen de resistencia a puromicina.

Para la selección con antibiótico, se cultivaron las células dos días en el medio de cultivo de las AFs. Después, se le añadió puromicina al medio de cultivo (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y luego se

cultivaron otros cuatro días en presencia de 2 μ g/mL de puromicina. Finalmente se volvió a poner una concentración de 0,5 μ g/mL (excepto dos pases antes del experimento).

Los controles sin infectar murieron completamente entre el día nueve y el once, pero durante todo el proceso fue necesario revisarlos. Las células resistentes, es decir, las que incorporaron el plásmido, son las que sobrevivieron.

Dado que el trabajo con virus expone a los trabajadores a una serie de riesgos, especialmente biológicos, las células inmortalizadas fueron proporcionadas por el personal cualificado del laboratorio.

1.3 Mantenimiento de las líneas celulares

La inducción del flujo autofágico en las células WT y las células que únicamente expresaban Atg4C se ha realizado en la sala de cultivos celulares. Es necesario tomar una serie de medidas de seguridad en esta sala como, por ejemplo, usar obligatoriamente bata, guantes y mascarilla; evitar la entrada en el laboratorio con material de fuera de la sala; usar exclusivamente el material de la sala de cultivos para esa sala, desinfectar con etanol 70% todo lo que entre o salga de la sala de cultivos, etc. Además, dentro de esta sala se deben respetar todas las medidas de higiene básica para evitar contaminaciones (ventanas cerradas, cerrar debidamente las puertas de acceso al laboratorio, limpiar las campanas de flujo antes y después de utilizarla con H₂O y EtOH 70%, limpiar inmediatamente cualquier derrame de medio de cultivo o suspensión celular, etc.).

Las células permanecieron en placas de cultivo en un incubador a 37 °C al 5 % de CO₂. El medio de cultivo requerido para el mantenimiento de las mismas fue el medio DMEM complementado con 50 ml de FBSi, 5 ml de piruvato sódico 100mM (100X), 5 ml de solución tamponadora HEPES 1 M, 5 ml de aminoácidos no esenciales (100X), 800 μ l de 2-Mercaptoetanol 50 mM, 5 ml de antibiótico – antimicótico y 5 ml de PSG.

Las células también se pueden mantener congeladas en un contenedor a -140 °C, en un medio compuesto por FBSi y 10 % DMSO en criotubos (el dimetilsulfóxido es un solvente altamente polar y su uso como crioprotector evita que se formen cristales que puedan dañar las membranas celulares durante el proceso de congelación).

1.4 Genotipado de las células

1.4.1 Extracción de ADN

Antes de realizar la inducción, se extrajo el DNA de las células plaqueadas para verificar su genotipo. Las células se trataron con buffer de lisis 2X (200mM Tris pH 7,4+200mM EDTA pH 8+1% SDS) y 10-20 mg/ml de proteinasa K, durante 2 horas a 55°C. La finalidad de esto era degradar las membranas y las proteínas presentes en la solución celular. Como también se quería degradar el RNA de la muestra se añadió RNasa A hervida. Para precipitar el DNA se empleó isopropanol y AcNH₄ 7,5M lavado con etanol frío al 70% y resuspendido finalmente en tampón TE (10mM Tris pH 8+1mM EDTA pH 8).

1.4.2 PCR, electroforesis en gel de agarosa y secuenciación

El genotipado de ATG4B, ATG4C y ATG4D se realizó por PCR (*Polymerase chain reaction*) usando oligonucleótidos específicos que hibridasen con regiones específicas de dichos genes que difieren entre los alelos WT y KO. En mi caso, las células fueron facilitadas ya genotipadas por el grupo de laboratorio. No obstante, a continuación, se explica brevemente el procedimiento.

A partir del DNA extraído de las líneas celulares, se añadieron los componentes necesarios para que se lleve a cabo la reacción: 1,6µl de dNTPS 2,5mM; 0,4µl de cada oligonucleótido 10 µmolar; 0,6µL de MgCl₂, 2µL de Buffer para PCR sin Mg²⁺, 1µL de DNA y 0,16µL de Taq DNA polimerasa. El programa de PCR se muestra en la tabla 1.

Tras la amplificación, las muestras resultantes se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TBE (Tris Boratos EDTA), usando bromuro de etidio para la detección de las bandas correspondientes a los amplicones de interés y el Marker V (Sigma-Aldrich®) para revelar el peso molecular de los mismos.

Para el gen *ATG4A* no se pudieron diseñar oligonucleótidos específicos ya es una línea obtenida por el sistema CRISPR/Cas9. Por ello, se determinó su genotipo por secuenciación mediante el método de Sanger.

TEMPERATURA	TIEMPO
95°C	5 minutos
95°C	30 segundos
T “annealing”	30 segundos
72°C	30 segundos
72°C	7 minutos
4°C	5 minutos

35 CICLOS

Tabla 1. Condiciones PCR. Considerar que las temperaturas de “annealing” son específicas para cada oligonucleótido (Atg4B a 58°C, Atg4C a 59°C y Atg4D a 60°C).

1.5 Inducción del flujo autofágico

Para inducir el flujo de autofagia se deben tener las células en buen estado y con una confluencia en torno al 70-80%. La dilución adecuada de la suspensión celular que dará la confluencia celular deseada en el cultivo varia de un tipo de célula a otro, así como de acuerdo con la duración y el tipo de tratamiento experimental. Por tanto, esto debe evaluarse empíricamente en cada caso. El día previo al ensayo, se plaquearon las células de cada línea en medio DMEM en cada placa de cultivo y una vez comprobado que tanto las células tanto *wild type* (wt) como TKO (*atg4abd/-*) estaban en buen estado se prepararon las cuatro condiciones diferentes (Figura 7):

- ✚ **Control de estudio:** da información sobre el flujo autofágico basal. Se utilizó el medio completo DMEM.
- ✚ **Ayuno:** Se empleó como medio bajo en nutrientes el medio EBSS 1X (flujo autofágico inducido por ayuno; NF:*nutrient free*). El medio EBSS 1X se caracteriza por presentar en su composición únicamente sales y glucosa en muy baja concentración (1 g/l), de forma que las células sufrieron una restricción calórica durante el ensayo y, por ende, inducción de la autofagia.
- ✚ **Control + Bafilomicina A1:** la Bafilomicina es un inhibidor de las últimas etapas de la autofagia ya que actúa en momento de fusión entre autofagosomas y lisosomas; la empleada en el estudio fue la Bafilomicina A1 (Enzo Life Science, Cat # BML-CM110-0100, CAS: 88899-55-2).
- ✚ **Ayuno + Bafilomicina A1.**

Una vez que se tienen las células bajo estas condiciones se deja durante tres/cuatro horas en el incubador (37 °C al 5 % de CO₂).

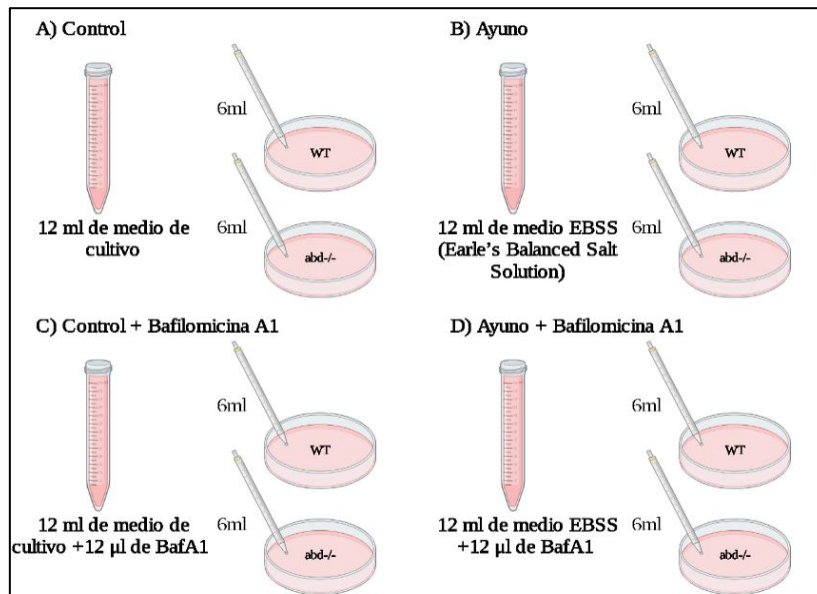


Figura 8: Condiciones en el flujo autofágico. A) Control, se emplea el medio de cultivo DMEM. B) Ayuno, el medio EBSS (sin aminoácidos) induce la autofagia. C) Control+BafA1 (La bafilomicina es un inhibidor de las últimas etapas de la autofagia, actúa en el momento de fusión entre autofagosomas y lisosomas). D) Ayuno +BafA1.

1.6 Extracción de proteínas

Tras la inducción del flujo autofágico pasadas tres/cuatro horas, se realizó la extracción de proteína de estas células para posteriormente analizarlas mediante la técnica de Western Blot.

Para la extracción proteica se llevaron a cabo los siguientes pasos:

- Aspirar el medio de cada pocillo donde están las células con las diferentes condiciones.
- Lavar con PBS 1X para eliminar los restos de medio y las células muertas. Es importante realizar todo en una campana de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones.
- Añadir a cada pocillo 250 µl de tripsina para que las células se desprendan y dejarlo en torno a 5 minutos en el incubador a 37°C y 5% de CO₂.

- Neutralizar la tripsina añadiendo 1ml de medio y pipetear arriba y abajo para despegar completamente las células del pocillo.
- Una vez despegadas, pasar a un tubo Eppendorf® de 1.5 ml y centrifugar dos minutos a 10.000 rpm.
- Extraer el sobrenadante y lavar el pellet con PBS 1X.
- Añadir el tampón de lisis RIPA para disgregar la membrana plasmática y liberar el contenido intracelular. Este tampón además contiene una solución que regula el pH, junto con inhibidores de proteasas y fosfatasas (se añade en torno a 30-60 µl del tampón RIPA a cada tubo Eppendorf®, dependiendo el tamaño del pellet). El tampón de lisis RIPA está compuesto por 100mM TRIS pH 7,4, 100mM EDTA pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1 % de SDS, 1% TRITON-X100, PhoSTOP y Complete.
- Dejar el homogeneizado 10 minutos en hielo reposando para que la lisis de las células se lleve a cabo completamente.
- Centrifugar 10 minutos a 4°C y 13.000 r.p.m.
- Recoger el sobrenadante donde está el extracto proteico de interés y pasarlo a un nuevo tubo Eppendorf® de 1,5 ml. El pellet contiene restos de membranas, entre otros componentes residuales.
- Cuantificar el extracto mediante el ensayo de ácido bincinonínico (BCA).

1.7 Cuantificación proteica

Antes de realizar la electroforesis en gel, es necesario cuantificar la cantidad de proteína total en la muestra de interés que se ha extraído previamente. Para ello, se empleó el método del BCA (ensayo del ácido bicinonínico), una prueba empleada para la detección colorimétrica y la cuantificación de proteínas. Este ensayo combina la reducción del ión cúprico (Cu^{2+}) a ión cuproso (Cu^{1+}) en un medio alcalino (reacción de Biuret) y la detección de este catión usando un reactivo que contiene el ácido bicinonínico. La intensidad del color producido es proporcional al número de enlaces peptídicos que participan en la reacción. El complejo BCA-cobre es soluble en agua y presenta una fuerte absorbancia lineal a 562 nm con concentraciones crecientes de proteína.

Una de las principales ventajas del ensayo BCA es que produce una curva de respuesta lineal, de esta forma se puede determinar de forma precisa la concentración de

proteínas desconocidas. El Kit empleado en el laboratorio fue el “BCA protein Assay Reagent PIERCE Prod, 23227” de la casa comercial Thermo Fisher Scientific el cual consta de dos reactivos: el reactivo A (*BCA protein Assay Reagent A*) que contiene principalmente carbonato y bicarbonato sódico, ácido bicinconínico y tartrato disódico, y el reactivo B (*BCA protein Assay Reagent B*) que contiene sulfato cúprico. Para cuantificar la cantidad de proteínas se elaboró una recta patrón en base a las absorbancias medidas para diferentes concentraciones conocidas de BSA (Figura 9).

Preparación de la recta patrón

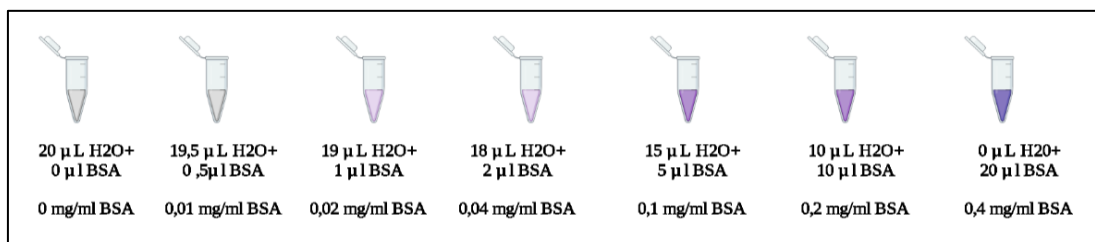


Figura 9. Preparación recta patrón. Coloración violácea progresiva de los estándares a medida que aumenta la concentración de BSA.

Además, se prepararon los tubos Eppendorf® con las muestras de interés de las cuales interesaba saber la concentración. Para ello, se añadió 2 μ l de muestra y 18 μ l de agua. En total, quedaron todos los Eppendorf® con un volumen de muestra final de 20 μ l.

El siguiente paso fue preparar el reactivo que da color a las muestras, este reactivo está compuesto por una mezcla de 50 partes del *BCA protein Assay Reagent A* y 1 parte del *BCA protein Assay Reagent B*. A continuación, se echaron 80 μ l de la mezcla a cada Eppendorf® (tanto de la curva patrón como de las muestras), obteniendo un volumen total de 100 μ l y se dejó incubando a 37°C media hora para que tenga lugar la reacción. Transcurrido el tiempo se midió la absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro (The Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer). Dentro del programa de Nanodrop se seleccionó la función de “BCA protein” y se realizó en primer lugar la recta patrón con los estándares. Lo idóneo es obtener un coeficiente de determinación superior al 0,99. Las concentraciones correspondientes a los extractos de interés se obtuvieron comparando las absorbancias resultantes con la concentración proteica correspondiente a la recta patrón para dicha absorbancia.

1.8 Preparación de los extractos

Una vez que sabemos la cantidad de proteína total por muestra, se rotularon nuevos Eppendorf® en los que se prepararon las muestras para la electroforesis en gel de poliacrilamida. Las muestras de proteínas se sometieron a una serie de procesos químicos y físicos para permitir su óptimo fraccionamiento en la electroforesis vertical.

La reacción consistió en hervir las muestras en presencia de SDS (desnaturaliza y da carga negativa uniforme y proporcional a la masa de la proteína) y β -mercaptoetanol (reduce los puentes disulfuro). En este trabajo se cargaron 15 μ g del lisado de proteína y un volumen total de 10 μ l por pocillo, por lo que se tuvo que calcular cuántos μ l de proteína y cuántos de tampón de carga se necesitaban (4X y 1X). El tampón de carga empleado contiene glicerol (aporta densidad a la muestra), azul de bromofenol (marcador del frente de avance de la electroforesis y de ayuda de visión de carga de los pocillos), SDS (importante en la desnaturalización y el establecimiento de una relación carga-tamaño constante en la proteína, de forma que la movilidad de la proteína durante la electroforesis sea exclusivamente proporcional a su peso molecular), β -mercaptoetanol (rompe los enlaces disulfuro), y tampón (estabilizar el pH).

Una vez preparado se sometió la mezcla a una temperatura de aproximadamente unos 95°C entre 5-10 minutos con el fin de desnaturalizar y obtener la estructura primaria de las proteínas de forma que el SDS pudiera unirse a ellas. Finalizado el tiempo, se centrifugó durante unos segundos y se empleó para electroforesis.

1.9 Análisis de proteínas mediante Western-Blot

La técnica de Western- Blot o inmunoblot sirve para la inmunodetección y cuantificación de proteínas específicas en homogenados celulares complejos. Esta técnica combina el poder de resolución de la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) o SDS-PAGE y la especificidad de los anticuerpos para detectar proteínas específicas. Las proteínas se resuelven sobre la base de su peso molecular en SDS-PAGE y se transfieren del gel de poliacrilamida a las membranas (nitrocelulosa o PVDF, en este trabajo se han empleado PVDF), creando una réplica exacta del patrón de separación de proteínas en la membrana.

La electroforesis en gel de poliacrilamida requiere la construcción de un hidrogel, el soporte donde tiene lugar la separación de proteínas. Los componentes del gel son: Acrilamida/bisacrilamida 37.5:1, 1,5M del tampón tris pH 8,8 + 0,4% SDS, 1,5M del

tampón tris pH 6,8 + 0,4% SDS, 25% persulfato amónico y TEMED (estos últimos generan los radicales necesarios para iniciar la reacción). Estos geles, compuestos por dos partes: separación y empaquetamiento, se colocaron en unas cubetas junto con tampón de reservorios 1X (192mM glicina, 25mM TRIS, 0,1% SDS). Las muestras se cargaron en los pocillos que se encuentran en la parte superior del gel (gel de empaquetamiento). En este trabajo se han cargado 15 µl por pocillo y se ha seleccionado un voltaje entre 75-150V y un amperaje constante de 25mA por gel durante toda la electroforesis.

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) activada previamente con metanol debido a su naturaleza hidrofóbica. La electrotransferencia se realizó fijando el voltaje a 50 V y amperaje máximo durante 2 horas en un módulo de transferencia en presencia de tampón de transferencia CAPS 1X (10 nM CAPS, 4 nM NaOH, 20 % MetOH).

Transcurridas las dos horas se bloqueó la membrana con el fin de evitar uniones inespecíficas por el anticuerpo a la superficie de la membrana. El bloqueo se llevó a cabo con leche al 5% y TBS-T 1X (Tris, NaCl y Tween20). El siguiente paso consistió en hibridar la proteína diana (que se había transferido del gel a la membrana de PVDF) con un anticuerpo primario. Para llevar a cabo este proceso se eliminó en primer lugar la solución de bloqueo y se añadió la solución de TBS-T con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% o BSA (en función de las especificaciones del fabricante). El anticuerpo primario se dejó durante toda la noche en agitación en la cámara fría de 4°C.

En este estudio, se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales:

- **Anti-SQSTM1** (M01, clon 2C11) (Abnova Corporation, nº de catálogo H00008878-M01); **anti-LC3A** (Proteintech, Cat # 12135-1-AP); **anti-LC3B** (Novus, Cat # NB600-1384); **anti-GABARAP** (MBL International, Cat # PM037); **anti-GABARAPL1** (ATG8L) (Proteintech, Cat # 11010-1-AP); **anti-GABARAPL2** (GATE-16) (MBL International, Cat # PM038); **anti-beta-actina** (Sigma-Aldrich, Cat # A2228) y **anti-GAPDH** (Novus Cat # NB300-320).

Tras la incubación con el anticuerpo primario se efectuaron tres lavados de 5 minutos con TBS-T 1X y un lavado final de 15 minutos en TBS-T 1X. A continuación, se procedió a añadir el anticuerpo secundario el cual se preparó en solución de TBS-T 1X al 3% de

leche. Es empleado normalmente a una concentración de 1:10000 y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante una hora. Transcurrido el tiempo se lavó con TBS-T 1X de la misma manera que el anticuerpo primario.

El anticuerpo secundario, que hibrida con el primario, está marcado con una enzima (peroxidasa de rábano) que, en presencia de luminol, emite una luz que se recoge en una cámara fotográfica de alta sensibilidad (equipo Odyssey®, LI-COR) y es esta señal la que representa a la proteína diana.

2. Flujo autofágico *in vivo*

Paralelamente al trabajo llevado a cabo con los cultivos celulares, se diseñó un experimento *in vivo* en el cual los ratones se sometieron a una serie de condiciones similares a las células con el fin de analizar el flujo autofágico en estos.

Estos ratones eran *knock-out* para la *atg4a*/Autofagina 2 y ratones WT controles, los cuales presentaban todas las autofaginas. Los ratones *knock-out* de *atg4a* fueron generados y genotipados (método de Sanger) previamente por el grupo de laboratorio y el experimento fue aprobado por el Comité de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo (Oviedo, España). Los grupos experimentales consistieron en compañeros de camada de diferentes genotipos, empleando machos y hembras para descartar diferencias dependientes del sexo.

Los ratones se agruparon en cuatro grupos diferentes: CONTROL, CONTROL + LEUPEPTINA, Ayunados y Ayunados + LEUPEPTINA. La leupeptina es un inhibidor de la autofagia que actúa sobre las serin y la cistein proteasas. En este trabajo se usó la Leupeptin hemisulfate; Selleckchem Cat nº s7380. La dosis empleada fue de 30 mg/kg, inyectando un volumen de unos 100 µl de leupeptina por cada 10 gramos de ratón (los ratones fueron pesados previamente).

El experimento se llevó a cabo durante tres días: el primer día se quitó la comida a todos los ratones por la noche, el segundo día se dio comida a todos los ratones durante tres horas. Después de las 3 horas se volvió a quitar la comida a todos los ratones. De esta forma se minimiza la variabilidad debido a las diferencias en la ingesta de alimentos antes de iniciar el flujo autofágico. El tercer día es cuando se realizó el experimento, es muy importante tener una cierta coordinación con los tiempos de sacrificio e inyección de leupeptina. A continuación, se explica cómo se desarrolló (Figura 10):

- **Tiempo 0 horas:** Dar de comer por cuatro horas a los ratones del grupo CONTROL+LEUPEPTINA y sacrificar al grupo AYUNO.
- **Tiempo 2 horas:** Inyectar leupeptina al grupo AYUNO +LEUPEPTINA.
- **Tiempo 4 horas:** Inyectar leupeptina intraperitonealmente al grupo CONTROL+LEUPEPTINA (llevaban 4 horas comiendo). En este tiempo también se da de comer al grupo CONTROL.
- **Tiempo 5 horas:** Sacrificar al grupo AYUNO+LEUPEPTINA (deben pasar tres horas desde que se inyecta la leupeptina hasta que se sacrifican).
- **Tiempo 7 horas:** Sacrificar al grupo CONTROL+LEUPEPTINA.
- **Tiempo 8 horas:** Sacrificar al grupo CONTROL, siendo este el último grupo experimental a sacrificar.

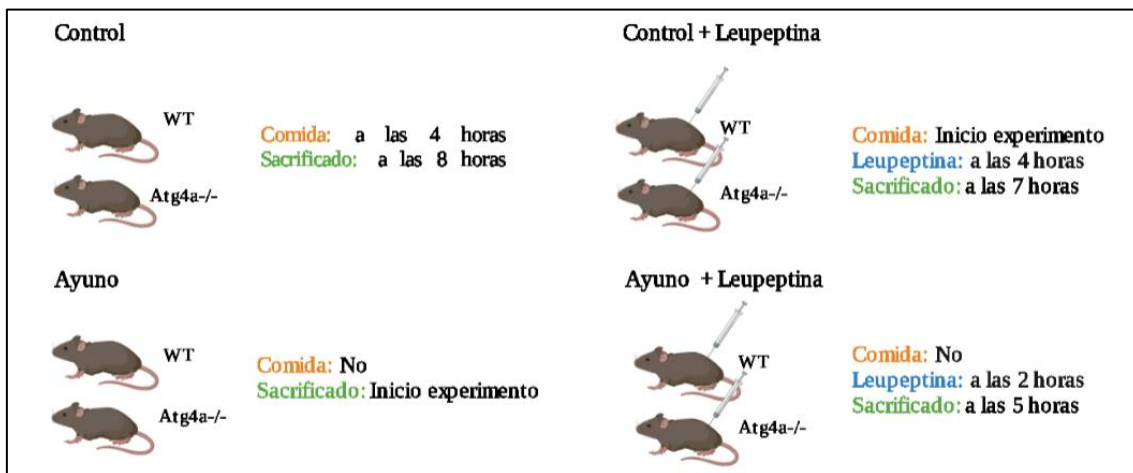


Figura 10. Esquema representativo del flujo autofágico *in vivo*.

A medida que se sacrificaban los ratones se extraían los tejidos de interés para el estudio: cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón, músculo, bazo, páncreas, timo y grasa.

Cada tejido se pesó en una balanza de precisión y se repartió de la siguiente manera: mitad del tejido en PFA 4% en PBS (análisis histológicos) y la otra mitad congelado en un Eppendorf® (análisis mediante Western Blot).

2.1 Preparación de los tejidos para análisis mediante Western-Blot.

Es muy importante que los tejidos permanezcan en hielo seco durante todo el proceso para así mantener la cadena de frío (-80°C). Lo primero que se hizo fue preparar el material que se iba a emplear: un bisturí desechable, unas pinzas, una placa Petri y unos tubos específicos para el homogeneizador de tejidos “Precellys” previamente rotulados con el ratón y tejido correspondiente. Se colocaron los tejidos de interés sobre la placa de Petri y se procedió a cortar lo más rápido posible para de esta forma evitar la degradación por las proteasas. Los cortes de tejido se colocaron en los tubos de precellys y se pesaron en la balanza de precisión (en torno a 15-50 mg). A continuación, se añadieron 6 beads por tubo y el tampón de extracción (RIPA + detergentes). La cantidad de RIPA que se añadió estuvo en torno a unos 200 µl por 10 mg de tejido. Hay que tener en cuenta que el detergente y los componentes del RIPA sean los adecuados para la lisis y posterior acondicionamiento (reducción y carga negativa). Este buffer de lisis está compuesto por 100mM TRIS pH 7,4, 100mM EDTA pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1 % de SDS, 1% TRITON-X100, PhoSTOP y Complete. El siguiente paso fue poner los tubos en el homogeneizador de tejidos (Precellys 24 tissue homogenizer, Bertin Technologies) y seleccionar el programa 6000:2:20:0,05. Una vez finalizado se colocaron los tubos en hielo en la cámara fría de 4°C hasta que bajó la espuma generada, aproximadamente media hora.

Una vez transcurrido el tiempo y con los tubos a una temperatura de 4°C se centrifugó a 13000 rpm durante diez minutos, se recogió el sobrenadante (SN) y se desechó el pellet. El último paso fue cuantificar el SN por BCA (mismo procedimiento que en las células).

RESULTADOS

1. Western-Blot

Con el fin de caracterizar las autofaginas, se analizaron mediante Western-Blot los tejidos correspondientes a los ratones WT y *atg4a* ^{-/-} que se les había inducido el flujo autofágico, así como de ratones y células que únicamente presentaban la autofagina 3/Atg4C. Estos ratones que únicamente presentan ATG4C fueron sacrificados anteriormente por el grupo de laboratorio.

La técnica del Western-Blot permite detectar la especificidad de las cistein proteasas ATG4 ya que, si no hay procesamiento, la banda II correspondiente al sustrato en su forma

lipidada no puede ser detectada puesto que esta modificación no es posible sin el procesamiento del sustrato. Esta es una técnica básica pero muy importante para evaluar la autofagia en un sistema experimental.

1.1. Análisis del flujo autofágico en los cultivos celulares mediante WB (WT Y atg4abd -/-)

El uso de bafilomicina A1, un antibiótico macrólido, nos da información sobre el flujo autofágico ya que aporta resultados en cuanto a la formación de los autofagosomas. La bafilomicina A1 interactúa específicamente con la bomba de protones V-ATPasa lisosomal, inhibiendo la acidificación, por lo que la degradación de los sustratos en su forma lipidada en la membrana interna del autofagosoma estará bloqueada, dando un resultado más preciso respecto al flujo autofágico en base a la proporción de formas lipidadas detectadas en las condiciones establecidas.

En condiciones de ayuno (medio EBSS), aumenta el flujo autofágico; esto se ve representado por un aumento de los sustratos lipidados en las células para formar los autofagosomas. Sin embargo, cuando las células permanecen un tiempo prolongado en condiciones de privación de nutrientes, la forma lipidada en la membrana interna del autofagosoma será degradada en el autolisosoma y los sustratos de la membrana externa serán delipidados y devueltos al citosol. A nivel experimental, esto ocurre durante las 3/4 horas que dura el ensayo de inducción por lo que la interpretación de los resultados en lo que respecta la formación de autofagosomas en función a la observación de formas lipidadas de cada sustrato puede verse sesgada. Por ello, es importante comparar la cantidad de las formas lipidadas (ATG8-II) en ausencia y en presencia de bafilomicina A1, para poder así interpretar bien los resultados obtenidos mediante los análisis Western-Blot y poder determinar el flujo autofágico.

Esto indica que un aumento en las cantidades de sustratos lipidados en la mayoría de los casos está relacionado con la inducción de la autofagia. Además, es importante remarcar que una privación de nutrientes prolongada aumentaría la muerte celular, y los tratamientos prolongados con inhibidores como la bafilomicina A1 tienen efectos adicionales en las células, pudiendo aumentar la autofagia en lugar de bloquearla.

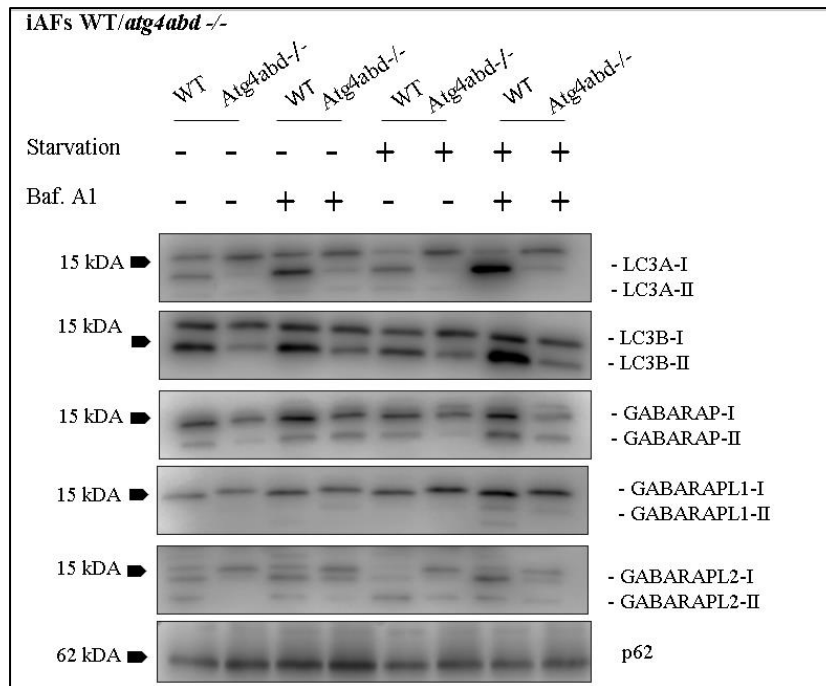


Figura 11. Análisis de los ortólogos de ATG8 en las diferentes líneas de estudio bajo las condiciones control, medio bajo en nutrientes (NF) y Bafilomicina A1 mediante Western-Blot.

En relación con esto, observamos en la Figura 11 que tanto en GABARAP L1 como en GABARAP L2 de las células *atg4abd*^{-/-} aparece una banda por encima con respecto a las WT. Esto podría corresponderse con la banda sin procesar de los sustratos. No obstante, el procesamiento no es del todo deficiente en el caso de GABARAP L2. Por el contrario, tanto en GABARAP como en LC3B aparece un procesamiento normal por estas células que únicamente presentan *Atg4C*.

En el caso de GABARAP L2 se aprecia que las células *atg4abd*^{-/-} acumulan poca banda lipidada; las WT para este sustrato tampoco acumulan mucha banda lipidada ni en presencia de inhibidores; mientras que en GABARAP sí que hay acumulación de banda lipidada en las células WT en condiciones de ayuno y de Bafilomicina A1.

En LC3A se observa que el procesamiento no es tan eficiente como el de LC3B y GABARAP, pero sí que hay intervención en la formación de los autofagosomas ya que aparece la banda lipidada más intensificada cuando añadimos Bafilomicina A1 con respecto al resto de los sustratos.

Por otro lado, también es importante estudiar los niveles de SQSTM1/p62 (p62), ya que es un adaptador que reconoce componentes citoplásmicos que han sido marcados por ubiquitinación para la degradación de la autofagia. De hecho, p62 actúa como enlace entre las moléculas objetivo y los sustratos Atg8 en la superficie interna de la estructura del autofagosoma, siendo degradado con ellos en el último paso del sistema. Así, los niveles de proteína p62 se correlacionan negativamente con un flujo de autofagia aumentado. Por ello, en las células WT lo esperado es que la proteína p62 aumente en presencia de Bafilomicina A1 y disminuya en condiciones de privación de nutrientes. Esto se ve reflejado en la Figura 11, aunque no sea muy evidente el cambio, sí que se aprecia que hay menos proteína p62 tras el ayuno con respecto a las células que contenían el medio con nutrientes. En el caso de la Bafilomicina A1 los cambios no son tan evidentes.

1.2 Análisis del flujo autofágico en tejidos mediante WB (ratones WT y *atg4a*^{-/-})

Cuando se sacrificaron estos ratones que eran KO para la autofagina 2/*atg4a* se observó que sus pulmones presentaban diferencias claras con respecto a los ratones WT, ya que eran morfológicamente diferentes y de un color rosáceo. Tras preparar los extractos se analizaron mediante WB.

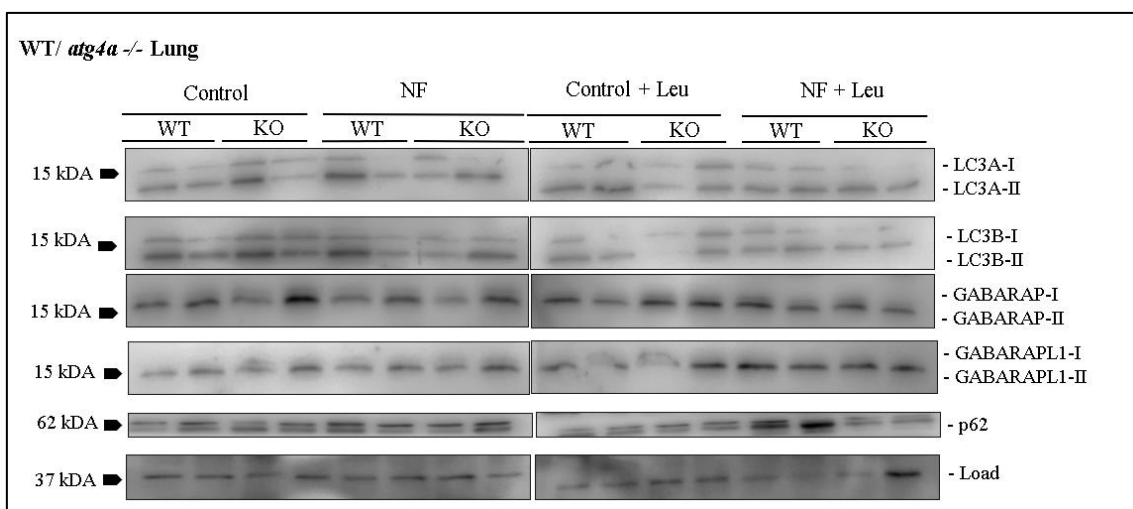


Figura 12. Análisis de los ortólogos de ATG8 en los pulmones de los ratones de trabajo bajo las condiciones control, ayuno y leupeptina mediante Western- Blot. GAPDH ha sido empleada como control de carga.

En este experimento *in vivo* se empleó como medidor de flujo autofágico la leupeptina. Como se muestra en la figura, parece no haber grandes diferencias para ninguno de los sustratos entre las células WT y los ratones KO para la autofagina 2/*atg4a*. Podrían

observarse pequeñas diferencias en las bandas correspondientes a GABARAP-I en los ratones ayunados y tratados con leupeptina ya que parecen estar por debajo con respecto al resto de las condiciones, especialmente en los ratones KO. Señalar que también se realizó la incubación de anticuerpos para el antígeno de GABARAPL2, pero los resultados obtenidos tras varios intentos no fueron interpretables.

En la proteína p62 sí parece haber cierta acumulación cuando los ratones WT están ayunados y tratados con leupeptina, sin embargo, son resultados poco concluyentes ya que tras la repetición de los Western-Blot para corroborar los resultados, la diferencia fue mínima con respecto al resto de las condiciones. Además, el experimento con la leupeptina parece no haber funcionado muy bien ya que al tratarse de un inhibidor lisosomal esperaríamos una acumulación de las bandas correspondientes a los sustratos que están unidos a la fosfatidietanolamina (banda lipidada). Esto no es apreciable en la Figura 12.

Dado que la bibliografía actual indica que Atg4A tiene un alto nivel de expresión en el **hígado** y que los cambios en las formas lipidadas de los sustratos son dependientes del tejido, se analizaron también los hígados de estos ratones (Figura 13).

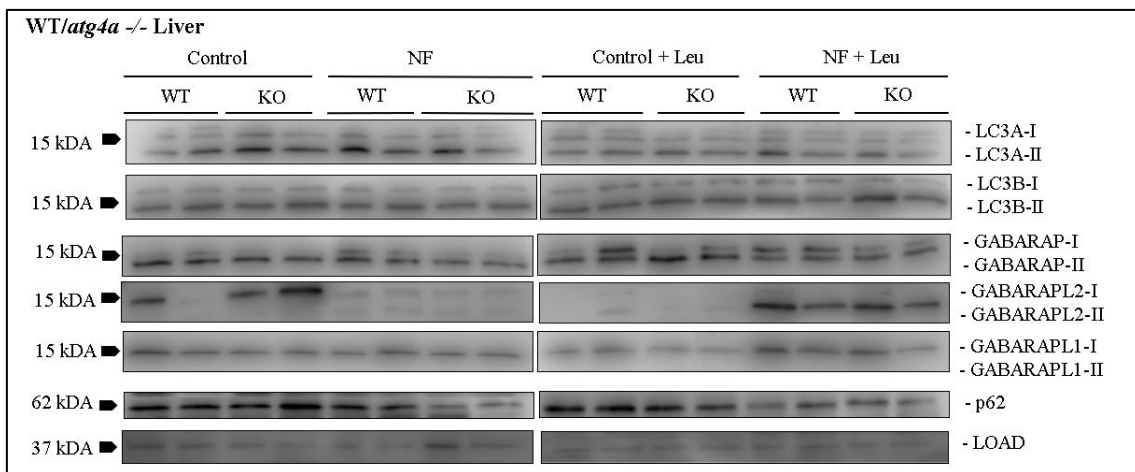


Figura 13. Análisis de los ortólogos de ATG8 en los hígados de los ratones de trabajo bajo las condiciones control, ayuno y leupeptina mediante Western-Blot. GAPDH ha sido empleada como control de carga.

Con respecto a la Figura 13, se aprecian diferencias en GABARAPL2 en condiciones control y ayuno en la banda I con respecto a la banda II tanto en los ratones WT como en los KO para Atg4A. En condiciones de ayuno estos ratones no acumulan banda I, pero al

hacer la proporción de banda II/banda I con respecto a los controles sí que es mayor, lo que puede indicar la participación de GABARAPL2 en la formación de los autofagosomas en estas condiciones en los ratones de estudio. Esto se corrobora en las bandas referentes a los ratones ayunados a los que se les inyectó leupeptina, ya que aparece una banda II claramente más significativa con respecto a los controles (tanto WT como KO). Sin embargo, las diferencias entre ambos genotipos no son apreciables.

En GABARAPL1 no se observa mucha diferencia, únicamente en los ratones ayunados y tratados con leupeptina que si parecen tener mayor cantidad de este sustrato.

En GABARAP parece haber una mayor acumulación de banda procesada en los ratones que han sido tratados con leupeptina frente a los que no han sido tratados con este fármaco, pero tampoco se ven diferencias claras entre genotipos.

Tanto en LC3A como en LC3B no parecen haber diferencias entre las condiciones y los genotipos (Figura 13).

Con respecto a p62, si se aprecia un aumento en presencia de leupeptina y una disminución en condiciones de privación de nutrientes tanto en los ratones WT, tal y cómo se esperaba. Lo mismo ocurre con los ratones KO, lo que sugiere que la autofagia funciona correctamente en estos ratones.

1.3 Análisis del flujo autofágico en tejidos mediante WB (ratones WT y atg4abd -/-)

Al igual que se realizó el flujo en células que únicamente presentaban la proteasa ATG4C, el grupo del laboratorio sacrificó meses antes ratones que eran KO para todas las autofaginas excepto la 3/ATG4C. Estos ratones no fueron tratados con leupeptina ya que presentaban un fenotipo severamente afectado. De estos ratones se analizó el músculo esquelético, el hígado, el cerebro, y el corazón.

En el **músculo esquelético** (Figura 14) se observan diferencias en todos los sustratos en la banda lipidada de los ratones que únicamente presentan ATG4C. Además, en los sustratos LC3 de estos ratones triple *knock-out* (*atg4abc*-/-) aparece una mayor proporción de sustrato sin lipidar que en el caso de las WT. Esto podría resultar confuso ya que estos ratones no presentan Atg4B, que es la principal proteasa encargada del procesamiento de los sustratos LC3. También se aprecia que en todos los sustratos hay mayor acumulación de banda lipidada en los ratones TKO que en los WT. Esto es lo

esperado ya que un estudio reciente de este grupo de laboratorio (29) describió el papel de ATG4D como principal proteasa delipidante. Estos ratones tampoco presentan esa autofagina por lo que es normal que acumulen más banda II que los WT.

En cuanto a p62 también se observa en la Figura 14 que hay mayor proporción de la proteína en los ratones TKO que en los ratones WT.

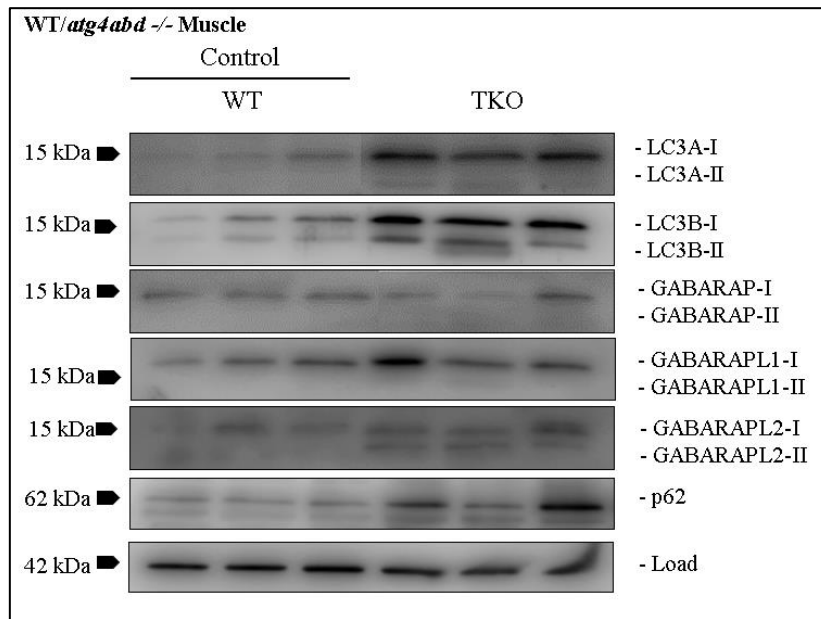


Figura 14. Análisis de los ortólogos de ATG8 en el músculo esquelético de los ratones que únicamente presentaban ATG4C mediante Western-Blot. La b-actina ha sido empleada como control de carga.

Con respecto al **hígado**, observamos en la Figura 15 que los ratones TKO presentan la banda correspondiente a GABARAPL1 ligeramente por encima con respecto a los WT, sugiriendo una posible deficiencia en estos ratones en el procesamiento de dicho sustrato. Algo similar ocurre para GABARAPL2, donde se aprecian diferencias en la altura de las bandas entre los ratones WT y los TKO.

Tanto en LC3A como en LC3B de estos ratones deficientes aparece mayor cantidad de sustrato respecto a los que son WT, tanto procesado como sin procesar.

La acumulación de p62 también es superior en los ratones *atg4abd*^{-/-} frente a los WT en este tejido.

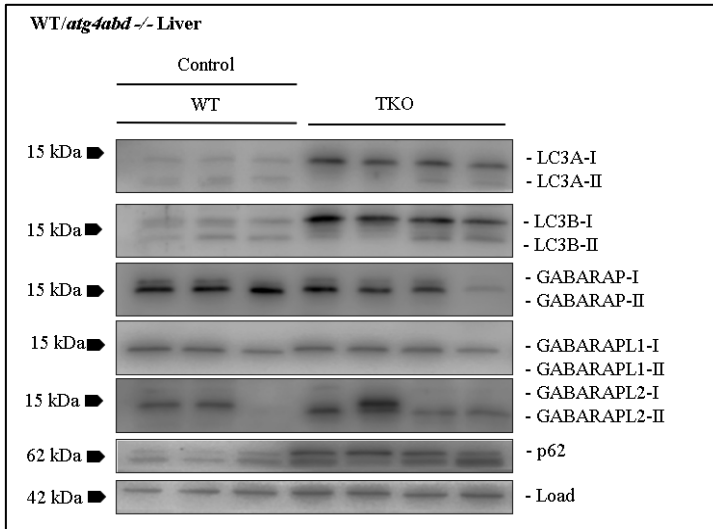


Figura 15. Análisis de los ortólogos de ATG8 en el hígado de los ratones que únicamente presentaban ATG4C mediante Western-Blot. La b-actina ha sido empleada como control de carga.

En el **corazón** estos ratones *atg4abd*^{-/-} presentan mayor acumulación de GABARAPL-I sin lipidar que los ratones WT. Además, aunque no es muy apreciable en la figura, los niveles de GABARAPL2 sin procesar parecen ser mayores que en los ratones WT. Algo similar ocurre para GABARAP (Figura 16).

En el caso de LC3A se observa una mayor proporción de LC3A-I frente a su forma lipídada LC3A-II en los ratones *atg4abd*^{-/-}, mientras que en los ratones WT aparece representada de manera más constante. LC3B parece comportarse de manera similar a LC3A, pero en este caso sí que aparece más banda lipídada en los ratones *atg4abd*^{-/-}. No obstante, al hacer la relación entre la banda sin lipidar con respecto a la banda lipídada, hay mayor proporción de banda sin fosfatidiletanolamina en los ratones TKO que en los ratones WT.

La acumulación de p62 también es ligeramente superior en los ratones *atg4abd*^{-/-}.

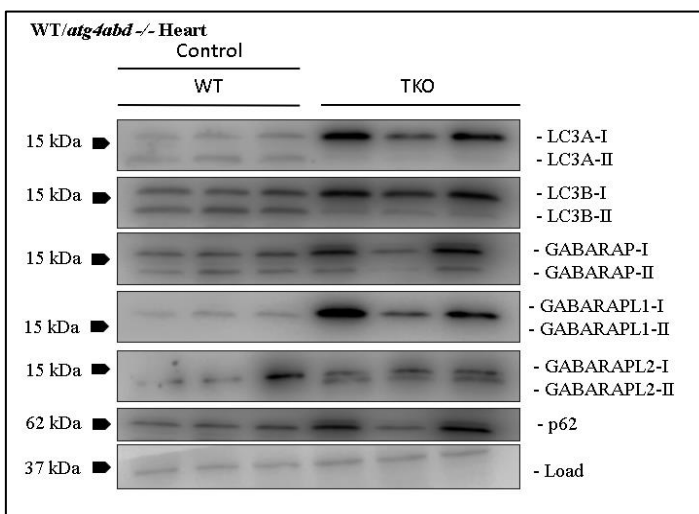


Figura 16. Análisis de los ortólogos de ATG8 en el corazón de los ratones que únicamente presentaban ATG4C mediante Western-Blot. GAPDH ha sido empleada como control de carga.

Finalmente, en el **cerebro** de estos ratones TKO también se observa en la Figura 17 que las bandas correspondientes a GABARAPL1 y GABARAPL2 están a diferente altura con respecto a la de los ratones WT. En el caso de GABARAPL2 se aprecian también bandas por debajo, sugiriendo una posible dificultad para delipidar el sustrato por estos ratones. Esto se relaciona por los niveles de p62 ya que aparecen aumentados en estos ratones con respecto a los WT, insinuando que el flujo autofágico no es del todo eficiente.

Con respecto a los sustratos LC3 se aprecia una clara acumulación de banda lipídada en los ratones TKO (Figura 17)

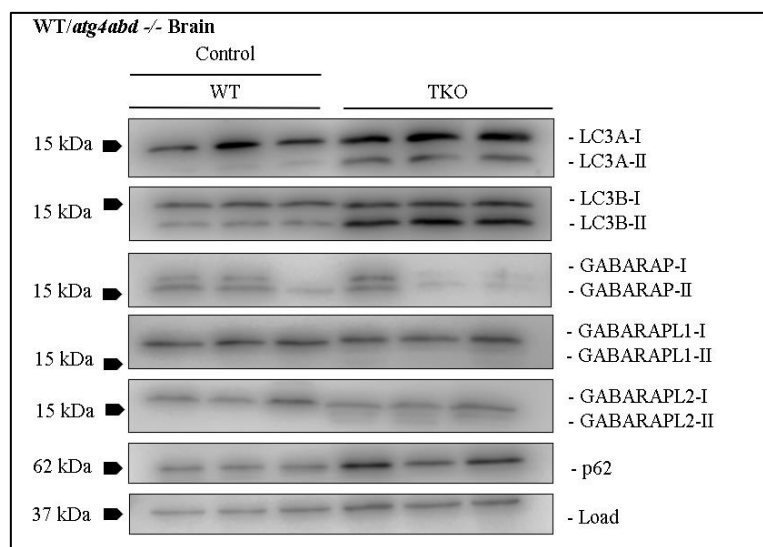


Figura 17. Análisis de los ortólogos de ATG8 en el cerebro de los ratones que únicamente presentaban ATG4C mediante Western-Blot. GAPDH ha sido empleada como control de carga.

2. Genotipado de las líneas celulares

El uso de oligonucleótidos que hibridasen con los diferentes alelos *Wild Type* y *knock-out* para cada gen permitió verificar el genotipo correspondiente a cada línea celular. En el Anexo II se muestra el patrón de bandas de las muestras de ADN resultantes tras la amplificación de regiones específicas de los genes *Atg4B*, *Atg4C* y *Atg4D*.

DISCUSIÓN

La aproximación al conocimiento del procesamiento de los sustratos ATG8 por las proteasas ATG4, especialmente ATG4C y ATG4A, ha sido posible en este trabajo gracias al empleo de controles celulares y animales que presentaban todas las proteasas ATG4 y, por ende, un correcto procesamiento y formación de autofagosomas.

En relación con los resultados observados en el Western-Blot de las líneas celulares, se puede ver que las líneas WT en condiciones de ayuno (Figura 11), es decir, que esperaríamos que en respuesta se indujera la autofagia hay un claro incremento en todos los sustratos lipidados de esta línea celular, con cambios especialmente notorios en la subfamilia LC3. En el caso de los sustratos de la subfamilia GABARAP (a excepción de GABARAP que se discutirá más adelante), la proporción en su forma unida a fosfatidiletanolamina es menor, lo que podría sugerir que no contribuyen de la misma manera en la autofagia. Pese a que actualmente se conoce que tanto la subfamilia LC3 como GABARAP son importantes, pero no imprescindibles, para la formación de los autofagosomas, la diferencial participación de ambas subfamilias en el proceso sigue sin estar del todo clara. Además, es importante considerar que durante el proceso autofágico, los sustratos lipidados se degradan en los autolisosomas, que es un marcador ampliamente utilizado para monitorear el proceso autofágico. Sin embargo, un mayor nivel de los sustratos lipidados en los Western-Blot no siempre son una indicación de inducción de autofagia, sino que pueden representar un bloqueo en la maduración del autofagosoma. Por lo tanto, el empleo de inhibidores de la degradación lisosomal como la Bafilomicina A1 ha sido crucial para la correcta interpretación de los resultados en lo que respecta a la formación de autofagosomas en función a la observación de formas lipidadas. En estas células WT se observa que, en efecto, hay una mayor acumulación de sustrato lipidado en condiciones de ayuno y tratamiento con Bafilomicina A1.

Así como en GABARAPL1 y GABARAPL2 no se ve mucha acumulación de banda lipidada, en GABARAP sí que se acumula en su forma lipidada con bafilomicina A1 y ayuno, sugiriendo la presencia de autofagosomas funcionales (ya que aumenta al añadir el inhibidor).

Otro marcador de flujo de uso frecuente es el secuestrosoma / p62; esta proteína se une a miembros de la familia Atg8 y funciona como receptor de carga para proteínas destinadas

al autofagosoma, degradándose también con ellos en el último paso del proceso. Por ello, cuanto menos p62 aparece en los Western-Blot nos indica que más inducción de autofagia se está produciendo en esas células. En la figura 11 se observa cómo en condiciones de ayuno estas células presentan menos acumulación de dicha proteína.

En las líneas que únicamente presentan ATG4C se observa en el Western-Blot cómo aparece una banda por encima con respecto a las WT, sugiriendo que esta proteasa presenta dificultades para procesar este sustrato. Esto sería muy interesante complementarlo en un futuro con líneas celulares que presentan todas las autofaginas a excepción de ATG4C para ver si el procesamiento es eficiente. En relación con esto, sí se esperaría un mayor procesamiento, ya que la bibliografía actual demuestra que ya que tanto ATG4B como ATG4A son las proteasas con mayor eficiencia catalítica frente a los sustratos. Sin embargo, como se comentaba en los resultados, el procesamiento de GABARAP y LC3B es aparentemente normal. Tanto en el caso de GABARAP como en LC3A se puede ver que, pese a que los niveles de banda lipidada en condiciones de ayuno sean inferiores que los de las líneas WT, hay cierta acumulación de banda lipidada en presencia de Bafilomicina. Esto no ocurre en LC3B, sí que hay procesamiento, pero no se acumula cuando añadimos el inhibidor, sugiriendo una menor eficiencia de la proteasa ATG4C por este sustrato.

Este trabajo anterior complementado con los ratones que únicamente presentaban Atg4C ha permitido hacer una aproximación del papel global de esta proteasa en un organismo entero. Al comparar los sustratos Atg8 de estos ratones triple KO (*atg4abd* ^{-/-}), con un fenotipo severamente afectado, frente a los ratones WT que presentan todas las autofaginas, se ha observado que dependiendo del tejido de estudio hay ligeras diferencias.

- En el músculo esquelético y en el cerebro (Figura 14 y Figura 18) estos ratones TKO presentan mayor proporción de forma lipidada en todos los sustratos que los ratones WT; sin embargo, si se observan los niveles de p62, hay mayor acumulación en los ratones deficientes de las autofaginas por lo que el correcto funcionamiento de la maquinaria autofágica podría no ser del todo eficiente en ausencia de la proteasa ATG4C en músculo. Como se mencionaba en el apartado de resultados, una posible explicación a la acumulación de banda lipidada, es la ausencia de ATG4D, descrita recientemente como principal proteasa delipidante.

Otra posible razón de las bandas lipidadas es que sean una acumulación de autofagosomas inmaduros que no maduraron o a que se esté dando una compensación funcional. En el caso de esto último, se podría dar que Atg4C procese en mayor proporción los sustratos por los que tenga mayor afinidad ante la ausencia del resto de proteasas ATG4 (especialmente LC3A y LC3B). Junto con esto, la figura muestra que el procesamiento de los sustratos de la subfamilia GABARAP no parece ser del todo eficiente.

- En el hígado parecen tener problemas en el procesamiento de todos los sustratos de la subfamilia GABARAP (Figura 15). En el caso de la subfamilia MAP-1/LC3 el procesamiento es eficiente pero la formación correcta de los autofagosomas no parece serlo del todo, ya que apenas presentan banda lipidada. Los mayores niveles de p62 con respecto a los WT podrían corroborar esta última hipótesis.
- En el corazón (Figura 16) estos ratones presentan mayor proporción de sustrato sin lipidar y menor de sustrato lipidado con respecto a los ratones WT. Esto podría sugerir que la autofagia está inducida y por ello el ritmo de degradación lisosomal es muy alto, apareciendo menos formas lipidadas; sin embargo, al analizar los niveles de p62 se observa una acumulación frente a los ratones WT.

Respecto al flujo *in vivo* con los ratones KO para *atg4a*, se trataron con leupeptina como inhibidor de los últimos pasos de la autofagia ya que el uso de la Bafilomicina A1 *in vivo* resulta nocivo debido a su toxicidad, provocando efectos negativos que no permiten ver los resultados en su adecuado contexto. Los resultados obtenidos no muestran que haya diferencias claras entre los genotipos; sin embargo, sí que parece haber diferencias en la forma lipidada de GABARAPL2 en el hígado de los ratones ayunados tras la inyección de leupeptina, señalando que la actividad autofágica difiere entre los diferentes tejidos siendo más elevada en el hígado. Esto podría reflejar una potencia o biodisponibilidad diferencial de la leupeptina en diferentes tipos de órganos. Otra explicación también podría ser que el hígado alberga niveles más altos de actividad macroautofágica basal.

Actualmente hay un proyecto en marcha en el laboratorio para realizar la caracterización de esta proteasa, ya que la actividad de ATG4A parece ser relevante en el proceso de autofagia, abriendo la posibilidad de emplearla como posible diana terapéutica en enfermedades causadas por una desregulación de este proceso.

CONCLUSIONES

Aunque los resultados que se han obtenido en este trabajo requieran de más investigación para corroborarlos y ampliarlos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Tanto con el flujo *in vitro* como *in vivo* se puede sacar en claro que **ATG4C** presenta cierta actividad biológica frente a los sustratos ATG8 pero que el proceso de autofagia no es del todo eficiente. El hecho de no tener ni ATG4A, ATG4B y ATG4C demuestra que hay un problema en el procesamiento y delipidación de los sustratos; y, por ende, de la maquinaria autofágica. Sería muy interesante seguir estudiando a estos ratones para hacer una mejor caracterización funcional de esta proteasa ya que, como se mencionó anteriormente, presentaban un delicado estado de salud.
- La leupeptina parece presentar una potencia o biodisponibilidad diferencial en diferentes tipos de órganos ya que aparecen diferencias claras entre los pulmones y el hígado en GABARAPL2-II.
- La proteasa **ATG4A** no presenta un papel indispensable en el procesamiento de las proteínas ATG8, ya que los resultados obtenidos mediante Western-Blot en tejidos de ratones deficientes de esta proteasa son muy similares con respecto a los de los ratones WT; no obstante, se quiere de más estudios para confirmarlo, así como el empleo de diferentes técnicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nature Cell Biology*. 2018;20(5):521-527.
2. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-741.
3. Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell*. 2019;176(1-2):11-42.
4. Yoshii S, Mizushima N. Monitoring and Measuring Autophagy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017;18(9):1865.
5. Mizushima N, Levine B, Cuervo A, Klionsky D. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*. 2008;451(7182):1069-1075.
6. Kaushik S, Cuervo A. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018;19(6):365-381.
7. Hurley J, Schulman B. Atomistic Autophagy: The Structures of Cellular Self-Digestion. *Cell*. 2014;157(2):300-311.
8. Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature Cell Biology*. 2013;15(7):713-720.
9. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Research*. 2013;24(1):9-23.
10. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 1993;333(1-2):169-174.
11. Klionsky D, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin M, Abeliovich H, Acevedo Arozena A et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
12. Ariosa A, Klionsky D. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *Journal of Molecular Medicine*. 2016;94(11):1217-1227.
13. Yang Z, Klionsky D. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2009;1-32.

14. Yeh Y, Wrasman K, Herman P. Autophosphorylation Within the Atg1 Activation Loop Is Required for Both Kinase Activity and the Induction of Autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2010;185(3):871-882.
15. Jung C, Ro S, Cao J, Otto N, Kim D. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*. 2010;584(7):1287-1295.
16. Zachari M, Ganley I. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays in Biochemistry*. 2017;61(6):585-596.
17. Fernández Á, Sebti S, Wei Y, Zou Z, Shi M, McMillan K et al. Disruption of the beclin 1–BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature*. 2018;558(7708):136-140.
18. Maruyama T, Noda N. Autophagy-regulating protease Atg4: structure, function, regulation and inhibition. *The Journal of Antibiotics*. 2017;71(1):72-78.
19. Fernández Á, López-Otín C. The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *Journal of Clinical Investigation*. 2015;125(1):33-41.
20. López-Otín C, Mariño G. Tagged ATG8-Coding Constructs for the In Vitro and In Vivo Assessment of ATG4 Activity. *Methods in Enzymology*. 2017:189-205.
21. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal*. 2010;29(11):1792-1802.
22. Li M, Fu Y, Yang Z, Yin X. Measurement of the Activity of the Atg4 Cysteine Proteases. *Methods in Enzymology*. 2017;207-225.
23. Mariño G, Salvador-Montoliu N, Fueyo A, Knecht E, Mizushima N, López-Otín C. Tissue-specific Autophagy Alterations and Increased Tumorigenesis in Mice Deficient in Atg4C/Autophagin-3. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(25):18573-18583.
23. Mariño G, Fernández A, Cabrera S, Lundberg Y, Cabanillas R, Rodríguez F et al. Autophagy is essential for mouse sense of balance. *Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(7):2331-2344.
24. DeSelm C, Miller B, Zou W, Beatty W, van Meel E, Takahata Y et al. Autophagy Proteins Regulate the Secretory Component of Osteoclastic Bone Resorption. *Developmental Cell*. 2011;21(5):966-974.
25. Zhang L, Li J, Ouyang L, Liu B, Cheng Y. Unraveling the roles of Atg4 proteases from autophagy modulation to targeted cancer therapy. *Cancer Letters*. 2016;373(1):19-26.

26. Yun C, Lee S. The Roles of Autophagy in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(11):3466.
27. Escobar K, Cole N, Mermier C, VanDusseldorp T. Autophagy and aging: Maintaining the proteome through exercise and caloric restriction. *Aging Cell*. 2018;18(1): e12876.
28. Mariño G, Fernández A, López-Otín C. Autophagy and Aging: Lessons from Progeria Models. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2010;61-68.
29. Tamargo-Gómez I, Martínez-García G, Suárez M, Rey V, Fueyo A, Codina-Martínez H et al. ATG4D is the main ATG8 delipidating enzyme in mammalian cells and protects against cerebellar neurodegeneration. *Cell Death & Differentiation*. 2021.

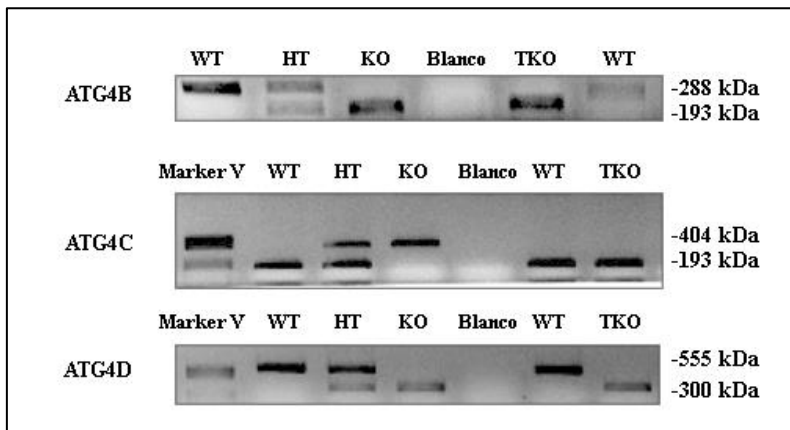
ANEXO I

Levaduras	Mamíferos	Funciones
Atg1	ULK1, 2	Complejo quinasa Atg1/Atg13/Atg17/Atg29.
Atg2	ATG2A, ATG2B	Complejo Atg2/Atg18/Atg9 (formación autofagosoma).
Atg3	Atg3	Enzima similar a E2 específica para Atg8 (inducción de autofagia).
Atg4	Atg4A, 4B, 4C, 4D	Cisteín proteasa: Escisión del extremo C-terminal de Atg8 y de-PE.
Atg5	Atg5	Complejo Atg12/Atg5/Atg16 (formación autofagosoma).
Atg6	Beclin-1	Subunidad del complejo Vps34 PI3K (formación autofagosoma).
Atg7	Atg7	Encima similar a E1: Tanto Atg8 como Atg12 son sustratos Atg7.
Atg8	LC3, GABARAP, GATE-16	Proteína similar a ubiquitina: Formación de Atg8-PE (fosfatidiletanolamina).
Atg9	ATG9A(APG9L1) TTG9B(APG9L2)	Complejo Atg2/Atg18/Atg9 (formación autofagosoma).
Atg10	Atg10	Enzima similar a E2 específica para Atg12 (inducción autofagia).
Atg11		Molécula adaptadora: Incorporación de API dentro de la vesícula Cvt en levaduras.
Atg12	Atg12	Proteína similar a ubiquitina: complejo Atg12/Atg5/Atg16.
Atg13	Atg13	Subunidad del complejo Atg1 (inducción de autofagia).
Atg14	ATG14, ATG14L, BARKOR	Subunidad del complejo Vps34 PI3K (inducción de autofagia).
Atg15		Proteína similar a lipasa: degradación del cuerpo autofágico en levaduras.
Atg16	ATG16L1, ATG16L2	Complejo Atg12/Atg5/Atg16 (formación del autofagosoma).
Atg17		Subunidad del complejo quinasa Atg1 (formación autofagosoma).
Atg18	WIPI-1, 2	Proteína de unión PIP3: Complejo Atg9/Atg2/Atg18.
Atg19		Receptor de API en la vía Cvt (levadura).
Atg20		Proteína de unión PI3P en la vía Cvt (levadura).
Atg21	WIPI-1, 2	Proteína de unión PI3P en la vía Cvt (levadura).
Atg22		Proteína de membrana de vacuola en levadura.
Atg23		Formación de vesícula Cvt en levadura.
Atg24		Vía Cvt y degradación de peroxisomas (levadura).
Atg25		Degradación de peroxisomas en levadura.
Atg26		Degradación de peroxisomas en levadura.

Atg27		Proteína de unión PI3P en vía Cyt (levadura).
Atg28		Degradación de peroxisomas en levadura.
Atg29		Subunidad del complejo quinasa Atg1 (inducción autofagia).
Atg30		Degradación de peroxisomas (Pexofagia).
Atg31		Complejo Atg17-Atg29-Atg31 en autofagia inducida por ayuno.
Atg32	BCL2L13	Degradación mitocondrias (Mitofagia).
Atg33		Degradación mitocondrias (Mitofagia).
Atg34		Transporte de alfa-manosidasa.
Atg35		Degradación de peroxisomas (Pexofagia).
Atg36		Degradación de peroxisomas (Pexofagia).
Atg37	ACBD5	Porteína de unión Acyl-CoA para formación de membrana de aislamiento.
Atg38		Interactúa con Atg14y Vsp34. Importante como unión entre Vps15-Vsp14 yVsp30/Atg6-Atg14.
Atg39		Autofagia selectiva de la membrana nuclear
Atg40		Autofagia selectiva del retículo endoplasmático
Atg41		Interactúa con Atg9 e involucrado en la formación de PAS (estructura pre-autofagosomal).

Anexo I. Proteínas ATG en levaduras y mamíferos y sus funciones (11).

ANEXO II



Anexo II. Genotipado de las líneas Wild Type, KO y TKO para los alelos *Wild Type* y *knock-out* en los genes *Atg4B*, *Atg4C* y *Atg4D*.

Se observa como amplificó la región *Wild Type* con los oligonucleótidos específicos para esa región mientras que en el caso de las líneas triples *knock-out* amplificó la región

knock-out con los oligonucleótidos específicos para dicha zona. Esto demuestra que las líneas celulares estaban correctamente genotipadas.

En el caso del gen *Atg4B* el peso molecular correspondiente al amplicón *Wild Type* presenta un peso molecular de 193 kDa mientras que las regiones *knock-out* el peso es de 288 kDa. En el gen *Atg4C* el amplicón *Wild Type* pesa 193kDa y el amplicón *knock-out* pesa 404 kDa. Para el gen *Atg4D* el amplicón *Wild Type* presenta un peso molecular de 555 kDa y el *knock-out* de 300kDa.

En lo que respecta a *Atg4A*, las líneas KO para este gen se obtuvieron por el grupo del laboratorio en trabajos previos mediante la técnica CRISPR/Cas9.