

Universidad CEU Cardenal Herrera
CEINDO - CEU Escuela Internacional de Doctorado
Programa en Tecnología y Ciencias de la Salud



Implicación de Rnd3 en la funcionalidad mitocondrial a través de autofagia

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Cristina Cueto Ureña

Dirigida por:
Dr. Enric Poch Jiménez
Dr. Ignacio Pérez Roger

VALENCIA
2019



Enric Poch Jiménez, Profesor titular del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera; e e **Ignacio Pérez Roger**, Catedrático del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU-Cardenal Herrera,

INFORMAN: que el trabajo titulado “Implicación de Rnd3 en la funcionalidad mitocondrial a través de autofagia” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad CEU - Cardenal Herrera por **Cristina Cueto Ureña**, Graduada en Biología.

Consideramos que este trabajo se encuentra terminado y reúne los requisitos necesarios para que la interesada pueda optar al título de Doctora por la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

Valencia, 29 de noviembre 2019

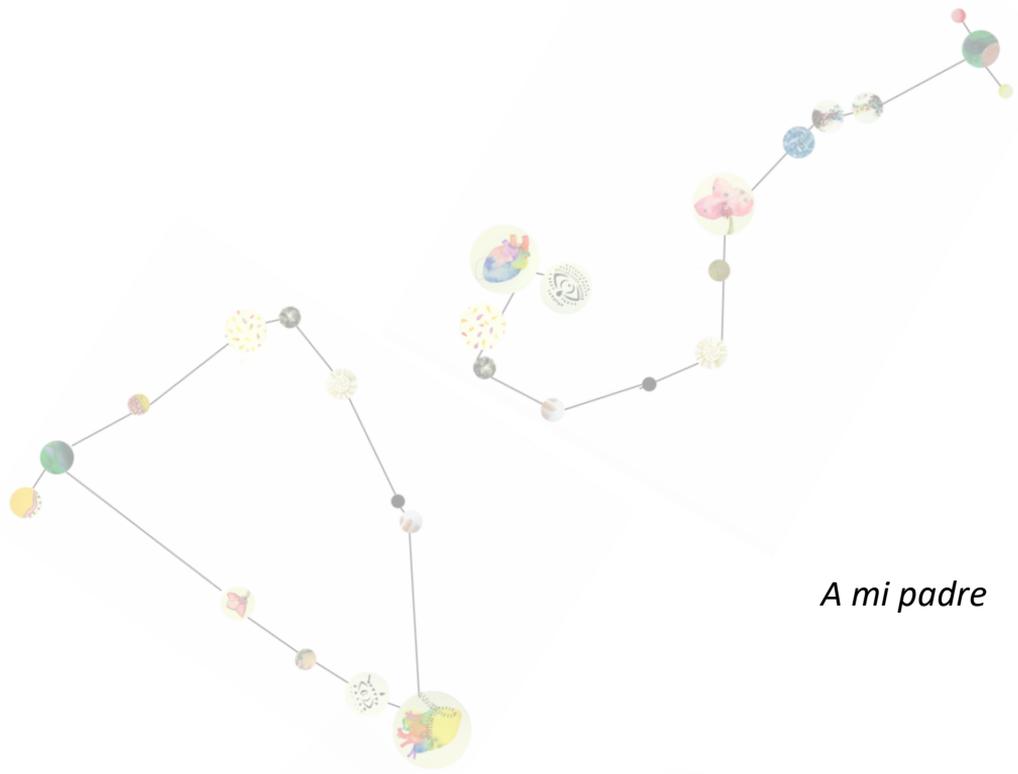
Dr. Enric Poch Jiménez

Dr. Ignacio Pérez Roger

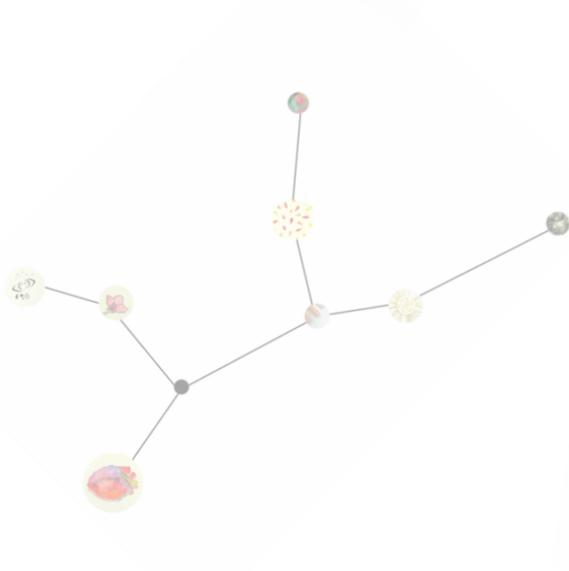
Este trabajo ha sido realizado con la financiación de Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-49176-C2-1-R), Generalitat Valenciana (AICO/2016/047) y gracias a un contrato predoctoral FPI-CEU de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y de la Generalitat Valenciana (ACIF16).

*En algún lugar, alguna cosa increíble
aguarda a ser descubierta.*

Carl Sagan



A mi padre



ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	5
RESUMEN.....	11
SUMMARY.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
1. Autofagia.....	25
1.1. Definición.....	25
1.2. Tipos de autofagia.....	25
1.3. Bases moleculares de autofagia.....	28
1.3.1. Iniciación: aislamiento de membrana y formación del fagoforo ...	29
1.3.2. Elongación del fagoforo y formación del autofagosoma incluyendo reconocimiento y selección del sustrato.....	31
1.3.3. Fusión entre autofagosoma y lisosoma.....	34
2. Implicación de autofagia en enfermedades del Sistema Nervioso Central.....	37
2.1. Autofagia en Neuronas.....	37
2.2. Autofagia y enfermedades neurodegenerativas.....	37
3. Papel del citoesqueleto de actina en autofagia.....	39
4. Familia de proteínas Rho.....	42
4.1. Proteínas Rho y su función en el citoesqueleto de actina.....	45
4.2. Implicación de proteínas Rho en el proceso de autofagia.....	47
5. Proteínas Rnd.....	49
5.1. Rnd3.....	50

5.1.1. Función de Rnd3	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. Animales.....	61
1.1. Estabulación	61
1.2. Genotipado	62
2. Líneas celulares.....	63
2.1. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y su inmortalización.....	63
2.2. Obtención de la línea 3T3 Rnd3 KO.....	64
3. Plásmidos y transfecciones	66
4. Inmunoblot de proteínas mediante western blot	67
5. Análisis de la proteólisis celular mediante ensayo de pulso y caza	71
6. Detección del flujo autofágico a través del marcador LC3.....	72
7. Experimentos de inhibición de Ulk1/2.....	75
8. Experimentos de inhibición de ROCK-I	75
9. Aislamiento de lisosomas.....	76
10. Estudio de la degradación de Rnd3	79
11. Ensayos de viabilidad celular.....	79
12. Citometría de flujo	80
13. Análisis metabólico	80
13.1. Análisis de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial.....	81
13.2. Análisis de la tasa de acidificación extracelular	82

14. Análisis estadístico.....	83
RESULTADOS	85
1. La ausencia de Rnd3 produce un aumento en la degradación de proteínas.....	87
2. La ausencia de Rnd3 produce un aumento en autofagia	89
3. La vía mTOR/Ulk no se ve alterada en ausencia de la expresión de Rnd3.....	101
4. La inhibición de ROCK-I no produce cambios en el proceso de autofagia en células NIH3T3	103
5. Rnd3 está presente en la membrana lisosomal pero no es un sustrato de degradación lisosomal.....	105
6. La funcionalidad de las mitocondrias se ve comprometida en ausencia de Rnd3	107
7. La ausencia de Rnd3 produce una alteración de la respiración mitocondrial.....	109
8. Las células 3T3 Rnd3 KO son dependientes de glucólisis	112
DISCUSIÓN	115
CONCLUSIONES	127
CONCLUSIONS	131
BIBLIOGRAFÍA.....	135

ABREVIATURAS



A

- ADN:** ácido desoxirribonucleico
- AFG:** autofagosoma
- AFGL:** autofagolisosoma
- ALR:** *autophagy lysosome reformation*
reforma de lisosomas autofágicos
- ARN:** ácido ribonucleico
- ARNg:** ARN guía
- ATG:** *autophagy related gene*
genes relacionados con autofagia
- ATP:** *adenosine triphosphate*
adenosín trifosfato
- AV:** *autophagic vacuoles*
vesículas autofágicas

B

- BSA:** *bovine serum albumine*
albúmina sérica bovina
- BafA1:** bafilomicina A1

C

- CMA:** *chaperone mediated autophagy*
autofagia mediada por chaperonas

D

- 2-DG:** 2-deoxy-D-glucosa
- DMEM:** *Dulbeccó's modified eagle's medium*

E

- ECAR:** *extracellular acidification rate*
tasa de acidificación
extracelular
- ELA:** esclerosis lateral amiotrófica

F

- FBS:** *fetal bovine serum*
suero fetal bovino
- FCCP:** carbonilcianuro-p-
trifluorometoxifenilhidrazona

G

- GAPs:** *GTPase activating proteins*
proteína que activa GTPasa
- GDIs:** *GDP dissociation inhibitor*
inhibidor de la disociación a GDP
- GDP:** guanosín difosfato
- GEFs:** *guanine nucleotide exchange factor*
factor intercambiador de nucleótido
de guanina
- GFP:** *green fluorescent protein*
proteína de fluorescencia verde
- GTP:** guanosín trifosfato
- GTPasa:** guanosina trifosfatasa

H

- HBBS:** *Hank's balanced salt solution*
- HDAC6:** desacetilasa de unión a ubiquitina
- HOPS:** *homotypic fusion and protein
sorting*
- Hsc70:** *heat shock cognate 71kDa*

L

- Lamp2A:** *lysosome associated membrane protein 2A*
proteína asociada a la membrana del lisosoma 2A
- LC3:** *microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*
proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
- LIR:** *LC3 interacting region*
interacción directa con LC3
- LPS:** lipopolisacárido

M

- MEF:** *mouse embryonic fibroblasts*
fibroblastos embrionarios de ratón
- MIRO:** *mitochondrial Rho protein*
proteína mitocondrial asociada a Rho
- MLC:** *myosin light chain*
cadena ligera de la miosina
- MLCK:** *myosin light chain kinase*
quinasa de MLC
- MLCP:** *myosin light chain phosphatase*
fosfatasa de MLC
- mTOR:** *mammalian target of rapamycin*
diana de la rapamicina en mamíferos
- Mtz:** metrizamida

O

- OCR:** *oxygen consumption rate*
tasa de consumo de oxígeno

P

- PAK:** *p21 activated kinases*
- PBS:** *phosphate buffered saline*
tampón fosfato salino
- PE:** fosfatidiletanolamina
- PI:** fosfatidilinositol
- PI3K:** fosfatidilinositol 3 - quinasa
- PI3KCIII:** PI3K de clase III
- PI(3)P:** fosfatidilinositol 3-fosfato
- P/S:** penicilina/estreptomicina

R

- RE:** retículo endoplasmático
- Rho:** *Ras homology*
homólogos de Ras
- ROCK:** *Rho-associated protein kinase*
quinasa asociada a proteínas Rho
- RMS:** *rostral migratory stream*
corriente migratoria rostral

S

- SEM:** *standard error of the mean*
error estándar de la media
- SNC:** sistema nervioso central
- SVZ:** *subventricular zone*
zona subventricular
- Stx17:** sintaxina 17

T

TBS: *tris buffered saline*
tampón tris salino

TBS-T: TBS con 0,05% tween 20

TMRM: tetramethylrhodamine methyl ester

U

UBL: *Ubikitin-like*

U. A.: unidades arbitrarias

Ulk: *Unc 51 like kinases*
kinasa tipo Unc 51

RESUMEN



Autofagia es el proceso por el cual se media el direccionamiento de material citoplasmático (proteínas y orgánulos) hacia los lisosomas para su posterior degradación. Su correcto funcionamiento es clave para mantener la homeostasis celular y controlar los niveles y la calidad de los constituyentes intracelulares, contribuyendo a la obtención de energía y permitiendo la adaptación de la célula a condiciones de estrés. Se ha descrito que un mal funcionamiento en el proceso de autofagia está relacionado con numerosas enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer o esclerosis lateral amiotrófica), siendo una característica común la presencia de agregados proteicos u orgánulos disfuncionales, que, en parte, acaban explicando la aparición de los distintos síntomas clínicos.

Las proteínas Rho, implicadas en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina, juegan un papel clave en el desarrollo y función del sistema nervioso central. Rnd3/RhoE es un miembro de la subfamilia Rnd y se caracteriza por estar constitutivamente activada. Su función en migración, proliferación y supervivencia celular ha sido ampliamente estudiada. Rnd3 es necesario para el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC. En nuestro grupo, la utilización de un modelo de ratón genéticamente modificado (Rnd3^{gt/gt}) ha demostrado que la ausencia de esta proteína produce graves alteraciones motoras y de desarrollo neural, destacando la presencia de agregados proteicos y mitocondrias morfológicamente aberrantes en neuronas, un fenotipo compatible con problemas en el proceso de autofagia, tal y como se ha descrito en algunas patologías neurodegenerativas.

En este estudio nos planteamos analizar el posible papel de Rnd3 en autofagia, con el objetivo de poder entender alguno de los fenotipos que aparecen en el modelo murino deficiente en esta proteína.

Nuestros resultados demuestran que la ausencia de Rnd3 aumenta la tasa de degradación proteica y provoca un aumento en autofagia en condiciones basales, sugiriendo que Rnd3 es un regulador negativo de este proceso, actuando a nivel de la maduración del autofagosoma. Además, hemos

Resumen

demostrado un nuevo papel de Rnd3 en la homeostasis mitocondrial. La presencia de mitocondrias no funcionales en células deficientes para Rnd3 provoca una alteración del metabolismo oxidativo y una activación de la glucólisis como mecanismo alternativo para la obtención de energía.

Todos estos resultados muestran un nuevo papel de Rnd3 en la regulación de autofagia, así como en la homeostasis mitocondrial, lo que podría explicar algunos de los fenotipos observados en el modelo de ratón deficiente para Rnd3.

SUMMARY



Autophagy is the cellular process by which lysosomes contribute to the degradation of intracellular components, including proteins and organelles. The correct function of this catabolic process is necessary for cell homeostasis and controls the levels and quality of intracellular constituents, not only contributing to obtaining energy but also allowing cells to adapt to stress conditions. It has been described that an alteration in the autophagy process is related to numerous neurodegenerative diseases (Parkinson's, Alzheimer's or amyotrophic lateral sclerosis). Moreover, autophagy malfunction leads to protein aggregates and dysfunctional organelles accumulation that can explain some of the clinical symptoms.

Rho proteins are involved in the regulation of the actin cytoskeleton dynamics and also have been postulated to play a key role in the development and function of the Central Nervous System. Rnd3/RhoE is a member of the Rnd subfamily, being constitutively activated. Its role in cell migration, proliferation and survival has been extensively studied. Rnd3 is necessary for the correct development and function of the CNS. In our group, the use of a genetically modified mouse model (Rnd3^{gt/gt}) revealed that the lack of this protein produces serious motor and neural development alterations. Moreover, Rnd3 deficient neurons show protein aggregates and aberrant mitochondria, a phenotype compatible with problems in autophagy, as also described in some neurodegenerative pathologies.

In this study we sought to analyze the possible role of Rnd3 in autophagy, in order to understand some of the phenotypes that appear in the Rnd3 deficient murine model.

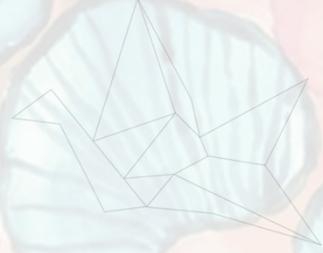
Our results demonstrate that the absence of Rnd3 promotes higher protein degradation rates and increased levels of autophagy even in basal conditions, suggesting that Rnd3 negatively regulates this process, at the

Summary

level of the autophagosome maturation. In addition, we have demonstrated a new role of Rnd3 in mitochondrial homeostasis. The presence of non-functional mitochondria in Rnd3-deficient cells causes an alteration in the oxidative metabolism and an activation of glycolysis as an alternative mechanism to obtain energy.

Altogether, these results highlight a new role of Rnd3 in the regulation of autophagy and mitochondrial homeostasis, which could explain some of the phenotypes observed in the Rnd3^{gt/gt} mouse model.

INTRODUCCIÓN



1. Autofagia

1.1. Definición

El término autofagia proviene del griego, que significa “comer” (“fagia”) “a sí mismo” (“auto”). En 1963, Christian de Duve fue el primer investigador en dar nombre a este proceso, basándose en la observación de vesículas intracelulares, de simple o doble membrana, que contenían porciones del citoplasma y orgánulos en diferentes estados de desintegración^{1, 2}. La autofagia está considerada el principal sistema de degradación celular, donde componentes citoplasmáticos dañados son dirigidos hacia el lisosoma para su degradación. Por otro lado, las células requieren de un continuo reciclaje de material citoplasmático con el fin de obtener energía. Es un mecanismo altamente conservado en eucariotas, desde levaduras hasta humanos, y está encargado del mantenimiento de la homeostasis celular. Por ese motivo la autofagia ha adquirido un papel esencial en diferentes procesos biológicos que implican situaciones de estrés, permitiendo la adaptación de las células a estas condiciones³⁻⁵. No obstante, este proceso también ocurre de manera constante en las células, recibiendo el nombre de “autofagia basal”, cuya principal función es actuar como “control de calidad” intracelular⁶.

1.2. Tipos de autofagia

Existen tres tipos de autofagia bien definidos: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA) (**Figura 1**). Todas ellas promueven la degradación de componentes citoplasmáticos en el lisosoma, sin embargo, difieren entre ellas en el mecanismo utilizado para la selección e incorporación del sustrato en el lisosoma, así como en la regulación del proceso⁷⁻⁹.

- **Macroautofagia** (también referida como autofagia) se lleva a cabo a través de una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma (AFG), la cual actúa como intermediario, fusionándose con el lisosoma y dando lugar a lo que se conoce como autofagolisosoma (AFGL), donde se produce la degradación del contenido. En algunos casos puede ocurrir que el AFG se fusione, en primer lugar, con endosomas tardíos, formando lo que se conoce con el nombre de anfisoma, y posteriormente con los lisosomas, donde tendrá lugar la degradación¹⁰.

- En **microautofagia**, los componentes citosólicos son directamente secuestrados por el lisosoma a través de invaginaciones de la membrana lisosomal, donde se produce rápidamente la degradación de los componentes internalizados. Este proceso se ha descrito en levaduras, donde se ha identificado un conjunto de proteínas compartidas con macroautofagia y otras únicas para este proceso. Sin embargo, no se han identificado los genes homólogos de este proceso en mamíferos, lo que hace que exista un menor conocimiento en organismos superiores^{7,9}.

En ambos casos, macro y microautofagia, son capaces de degradar el contenido a través de mecanismos selectivos y no selectivos^{1,9,11}.

- Por último, la **autofagia mediada por chaperonas (CMA)** es un proceso selectivo donde las proteínas a degradar son marcadas previamente y translocadas a través de la membrana lisosomal. Para ello forman un complejo junto con algunas proteínas de la familia de las chaperonas, entre las cuales se encuentra la chaperona Hsc70, que reconoce a proteínas que contienen en su secuencia un motivo específico de aminoácidos, KFERQ, facilitando su translocación a través del receptor asociado a la membrana lisosomal 2A (Lamp2A), para su posterior degradación^{8,12}.

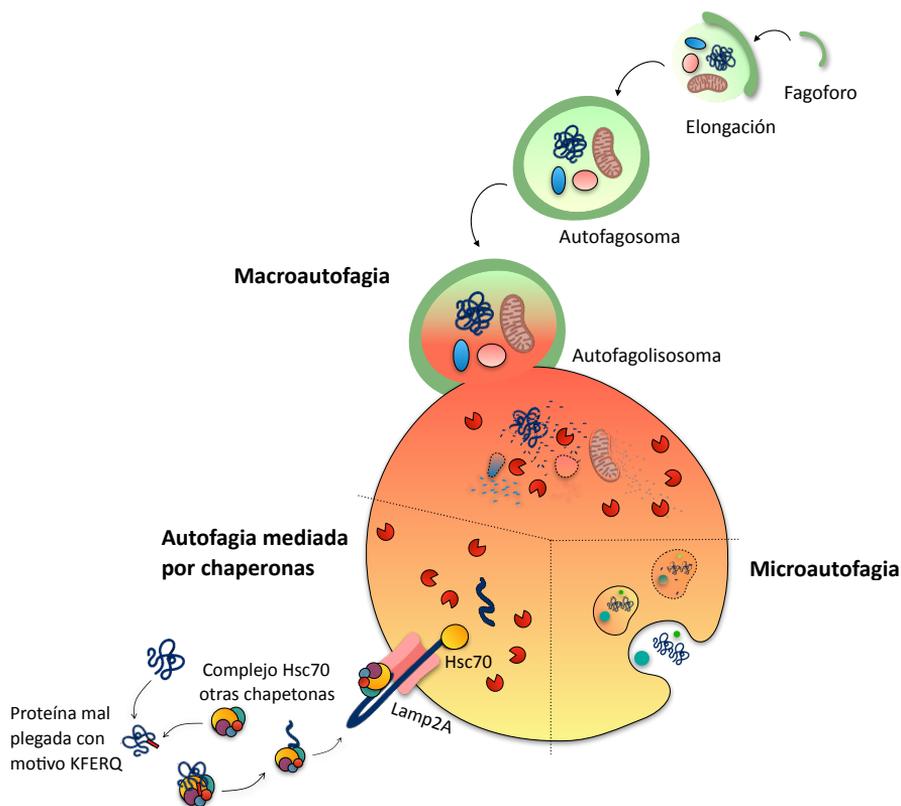


Figura 1. Principales tipos de autofagia. Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). Modificado de Martínez-Vicente, 2007¹³.

Por otro lado, en las últimas décadas, se han descrito nuevas formas de autofagia selectivas, en función del sustrato a degradar y que se activan tras someter a las células a distintos tipos de estrés. En este caso puede requerirse el uso de poblaciones de membranas específicas que contribuyan a la selectividad del reconocimiento del sustrato, pudiendo ser: mitocondrias (mitofagia), agregados proteicos (agrefagia), peroxisomas (pexofagia), ribosomas (ribofagia), retículo endoplasmático (RE) (reticulofagia) o patógenos (xenofagia)^{14,15}.

1.3. Bases moleculares de autofagia

Macroautofagia (referida de ahora en adelante como autofagia) es la variante de autofagia mejor caracterizada. A nivel molecular, es un proceso muy complejo y altamente regulado. El mecanismo a través del cual se forman las vesículas autofágicas (AV) tiene lugar mediante una serie de pasos secuenciales que se pueden dividir de la siguiente forma: i) iniciación y aislamiento de membrana, formando el fagoforo; ii) elongación del fagoforo y formación del AFG, incluyendo el reconocimiento y selección del sustrato; iii) fusión entre AFG y lisosoma; y finalmente, iv) degradación y posterior liberación al citosol de los componentes degradados para su reciclaje^{1, 11, 16}, tal y como muestra la **Figura 1**.

La mayor parte de los avances a nivel molecular sobre cómo se lleva a cabo el proceso de autofagia se ha realizado en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*)¹⁷. En los años 90, Tsukada y Ohsumi identificaron, mediante estudios genéticos, una serie de genes relacionados con autofagia que reciben el nombre de **ATG (AuTophagy-related genes)**. Actualmente, se han descrito un total de 32 genes, que se conservan de levaduras a mamíferos^{1, 2, 18, 19}. Estos genes regulan cada una de las etapas de autofagia, y se han clasificado en seis grupos debido a la organización necesaria de diferentes complejos proteicos ATG, responsables de que tenga lugar cada una de las fases del proceso: 1) el complejo kinasa Ulk1 (Ulk1-Atg13-FIP200-Atg101), encargado de la iniciación; 2) Atg9, implicado en el tráfico de membranas recicladas para la formación de la doble membrana del AFG; 3) el complejo fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) de clase III (Vps34-Beclin1-Vps15-Atg14), necesario para el aislamiento de membrana; 4) el complejo fosfatidilinositol 3-fosfato (PI(3)P) de unión a WIPI1/2; 5) el sistema de conjugación Atg12-Atg5-Atg16L; y 6) el sistema de conjugación de LC3 implicando a la fosfatidiletanolamina, (LC3-PE) para la elongación de la membrana^{1, 20}. A continuación se explican cada una de las distintas fases en mayor detalle:

1.3.1. Iniciación: aislamiento de membrana y formación del fagoforo

A pesar de que autofagia ocurre de forma basal en la mayoría de las células, es principalmente activada tras un estímulo, como es la ausencia de nutrientes (estrés nutricional)²¹. En levaduras, el proceso de autofagia se inicia con la formación de una estructura citosólica de membrana simple, similar al AFG, que recibe el nombre de **estructura pre-autofagosomal (PAS)**²². A nivel molecular, el primer gen identificado en este proceso fue *Atg1*, que codifica para la proteína *Atg1*²³. Esta proteína es una serina/treonina kinasa, que se encuentra asociada a otras proteínas *Atg*^{24,25}. En organismos superiores se han identificado dos homólogos de *Atg1*, *Ulk1* y *Ulk2*, siendo suficiente su silenciamiento para inhibir autofagia. Del mismo modo que *Atg1*, *Ulk* se relaciona con otras proteínas formando un complejo funcional imprescindible para el inicio del proceso, que es morfológicamente diferente al de levaduras^{26,27}.

En mamíferos, primero de todo, tiene lugar la formación de una estructura en forma de Ω , sobre la membrana del RE, que recibe el nombre de **omegasoma**. En esta estructura tiene lugar el aislamiento de doble membrana que recibe el nombre de **fagoforo**^{28,29} (**Figura 2**). Hasta ahora, se desconoce su origen, aunque se sabe que participa más de un tipo de membrana, incluyendo RE, mitocondrias, Golgi, membrana plasmática y endosomas tardíos³⁰⁻³⁴.

Un sensor intracelular que integra señales metabólicas transmitidas por factores hormonales, estrés, disponibilidad de nutrientes y estado energético de la célula, es la serina/treonina kinasa mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), presente en todas las células eucariotas. En respuesta a estas señales, mTOR es capaz de regular numerosas funciones fisiológicas, entre las que se encuentra autofagia^{35,36}. Tanto en levaduras como en organismos superiores, *Atg1/Ulk* son dianas de TOR/mTOR, respectivamente. La fosforilación de *Atg1/Ulk* por TOR/mTOR resulta en la supresión de la formación del fagoforo, y por tanto en la inhibición de la inducción de

autofagia^{21, 37}. Asimismo, en los últimos años se ha descrito que Atg13, proteína que forma parte del complejo Atg1/Ulk, también presenta varios residuos fosforilables por TOR/mTOR. Dicha fosforilación provoca una menor afinidad de Atg13 por Atg1/Ulk impidiendo que se forme el complejo y por tanto inhibiendo el proceso^{27, 38, 39}. Así, la inhibición de TOR/mTOR, ante una situación de estrés nutricional o durante el tratamiento con rapamicina, resulta en un aumento de la actividad kinasa Atg1/Ulk, favoreciendo su asociación con Atg13 y permitiendo que tenga lugar la etapa de iniciación y aislamiento de membrana^{40, 41}. Otra proteína que forma parte de este complejo y que promueve la actividad catalítica de Atg1/Ulk es Atg17 (en levaduras) / FIP200 (en mamíferos)⁴². Por otra parte, en mamíferos se ha descrito un cuarto componente de este complejo, que recibe el nombre de Atg101, cuya función parece ser la de proteger a Atg13 de la degradación proteasomal⁴³.

Así, en mamíferos, el primer complejo proteico que se forma para activar e iniciar el proceso de autofagia es Ulk-Atg13-FIP200-Atg101 (**Figura 2**). Para que este complejo sea funcional, es necesaria la translocación de Ulk a la membrana del RE, incluyendo la activación de Vps34, una fosfatidilinositol 3 kinasa de clase III (PI3KCIII) que estimula la síntesis de fosfatidilinositol trifosfato (PI(3)P)⁴⁴. Vps34, se encuentra en vesículas próximas al RE y usa como sustrato el fosfatidilinositol (PI) para la síntesis de PI(3)P, el cual también se transloca a sitios del RE, siendo requerido para la estabilización del complejo Ulk en el omegasoma³⁰. Además, tras la inducción de autofagia, Vps34 interacciona con otras proteínas como Beclin1 (Atg6 en levaduras), lo que aumenta la actividad catalítica de Vps34, e incrementa, por tanto, los niveles de PI(3)P en el omegasoma^{45, 46}. Finalmente, la presencia de PI(3)P en el omegasoma facilita el reclutamiento de algunos de sus efectores, tales como DCFP1y WIP1³⁰ y proteínas reguladoras adicionales (UVRAG, BIF-1, Atg14L y Ambra) que pueden formar parte del complejo Beclin1-Vps34-Vps15, promoviendo la formación del fagoforo (**Figura 2**), así como su elongación y las siguientes etapas de autofagia^{1, 47}.

Otra proteína implicada en esta etapa es Atg9, la única proteína transmembrana de autofagia que co-localiza con el complejo Ulk²⁹. De este modo, vesículas procedentes de Golgi que contienen Atg9 se localizan en el omegasoma (**Figura 2**) facilitando la formación y expansión del fagoforo⁴⁸.

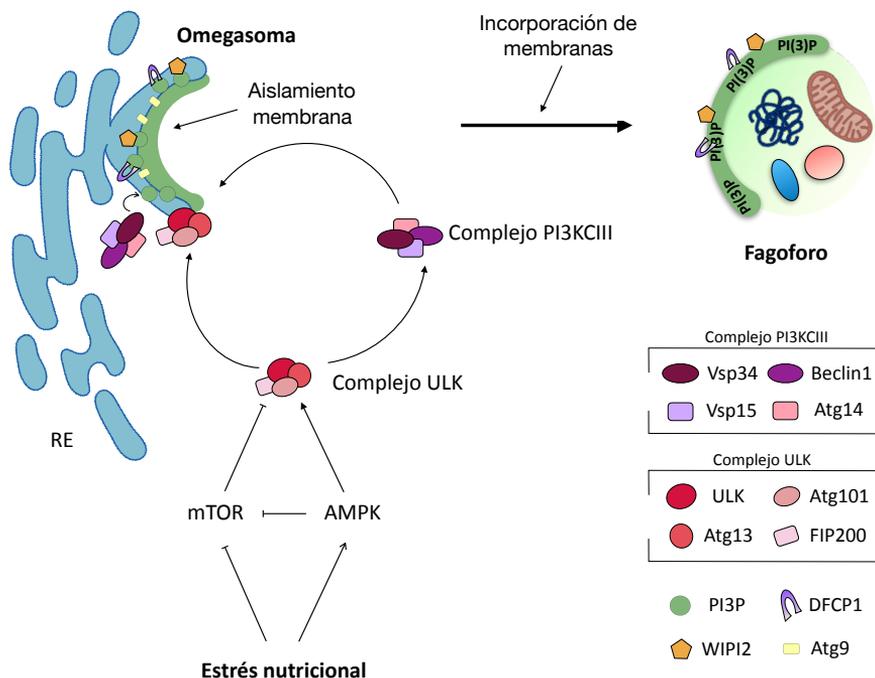


Figura 2. Esquema de la inducción e iniciación del proceso de autofagia. El proceso comienza con la formación de una estructura sobre el RE que recibe el nombre de **omegasoma**, a través del cual comienza el aislamiento de membrana (rica en PI(3)P) que da lugar a lo que se conoce con el nombre de **fagoforo** en mamíferos. Dos complejos relevantes en este proceso son Ulk-Atg13-FIP200-Atg101 y Beclin1-Vps34-Vps15-Atg14L.

1.3.2. Elongación del fagoforo y formación del autofagosoma incluyendo reconocimiento y selección del sustrato

Una vez se inicia la formación del fagoforo, el siguiente paso es su elongación, así como el reconocimiento y selección del sustrato y el cierre de

la doble membrana para la formación del **autofagosoma (Figura 3)**. Este proceso es dependiente de dos sistemas homólogos al sistema de ubiquitilación (UBL, *ubiquitin-like*)^{49, 50}. En el primero de los sistemas, Atg7 actúa como una enzima activadora de ubiquitina E1 que, en presencia de ATP, activa a Atg12, la cual es transferida a Atg10, una enzima conjugadora de ubiquitina E2, que potencia la unión entre Atg12 y Atg5^{51, 52} (**Figura 3**). Una vez conjugadas estas proteínas, forman un complejo multimérico con Atg16L⁵³⁻⁵⁵. En los últimos años se ha descrito que el complejo Atg5-Atg12-Atg16L tiene que localizarse en la membrana del omegasoma para que culmine la extensión del fagoforo, ya que facilita la conjugación de LC3²⁸. Para ello es necesaria la unión entre Atg16L y WIPI2b, dependiente de PI(3)P⁵⁶. Por otro lado, se ha demostrado que, en presencia de ciertos tipos de estrés celular el proceso de autofagia puede ocurrir de forma independiente a Atg5/Atg7, sugiriendo que hay una vía alternativa para la formación de los AFG^{57, 58}.

El segundo sistema de formación del fagoforo es el procesamiento de la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera A1/B1 3 (LC3), homólogo de Atg8 en levaduras. LC3 es procesado por la cisteína proteasa Atg4⁵⁹, generando la proteína citosólica LC3-I y quedando expuesta una glicina en el extremo C-terminal⁶⁰, la cual será activada por Atg7. Una vez se activa LC3-I, ésta se transfiere a Atg3 (conjugadora de ubiquitina E2), una proteína transportadora que permite la conjugación de fosfatidiletanolamina (PE) con la glicina del extremo C-terminal de LC3-I, generando en este caso, LC3-II⁶¹. El reclutamiento y la integración de LC3-II en el fagoforo es dependiente de Atg5-Atg12⁶², permitiendo la elongación y el cierre del AFG (**Figura 3**).

Asimismo, se ha demostrado que la unión entre WIPI2b y Atg16L y la presencia de PI(3)P en la membrana son necesarios para la lipidación de LC3^{56, 63}. LC3 permanece durante todo el proceso en la membrana del AFG (interna y externa), incluso cuando se fusiona con el lisosoma⁶¹. Sin embargo, Atg5-Atg12 conjugados son excluidos de la membrana del AFG maduro⁶⁴. Es por

ello que el principal marcador para el estudio de autofagia es LC3, ya que sus niveles correlacionan con el número de AFG y/o AFGL^{1, 56, 65}.

Por otro lado, otros autores han descrito que la presencia de LC3 en la membrana del fagoforo permite interactuar selectivamente con moléculas, reconociendo y seleccionando el contenido a degradar. De modo que LC3 actúa como receptor de autofagia, interactuando con moléculas presentes en el sustrato a degradar, que se conocen con el nombre de receptores de sustrato⁶⁶.

Un receptor de sustrato presenta tres características fundamentales: interacción directa con LC3 a través de la región de interacción con LC3 (LIR); capacidad inherente de polimerizar o agregar; y sitio de reconocimiento específico para el sustrato. Entre los receptores de sustrato, el mejor caracterizado es p62/SQSTM1⁶⁷, una proteína multi-funcional que promueve la degradación de agregados proteicos poli-ubiquitilados^{66, 68}.

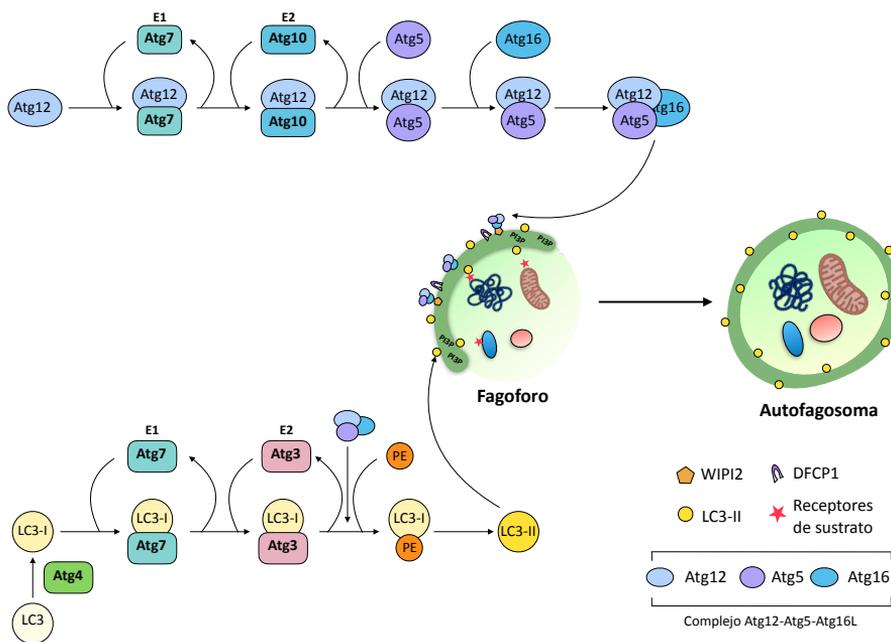


Figura 3. Esquema del proceso de elongación del fagoforo y formación del autofagosoma. En esta etapa intervienen dos sistemas UBL, permitiendo la formación del complejo Atg5-Atg12-Atg16L y el procesamiento de LC3 para dar lugar a LC3-II, principal marcador de autofagia. Además tiene lugar el reconocimiento y la selección del sustrato a degradar.

1.3.3. Fusión entre autofagosoma y lisosoma

Después del cierre de la doble membrana del AFG, es necesaria su maduración y la fusión con el lisosoma, para, finalmente, degradar su contenido. Sin embargo, ante una situación de estrés nutricional, un gran número de AFG se forman a lo largo del citosol⁶⁹, mientras que la formación de lisosomas es en la zona perinuclear⁷⁰. Por tanto, para que tenga lugar la fusión, los AFG se mueven hasta el lugar donde se encuentran los lisosomas. Este movimiento es dependiente de microtúbulos⁷¹, así como del complejo dineína-dinactina⁷², y no tiene lugar hasta que los AFG se han formado por completo. Otras proteínas implicadas en este movimiento son las proteínas motoras kinesinas, así como la familia de proteínas motoras de la miosina, e

incluso LC3, aunque el mecanismo de acción de este último permanece desconocido⁷³⁻⁷⁵.

Una vez el AFG y el lisosoma se encuentran próximos, el siguiente paso que tiene lugar es la fusión entre la membrana externa del AFG y la membrana del lisosoma. Para que este fenómeno tenga lugar, existen varios factores de anclaje que contribuyen a ello, pudiendo clasificarse en 3 categorías: los complejos de anclaje a membrana, tal como el **complejo HOPS** (*homotypic fusion and protein sorting*)⁷⁶; **Rab7**, una proteína GTPasa de pequeño tamaño que se localiza tanto en endosomas tardíos como en lisosomas^{77, 78}; y adaptadores que permiten conectar componentes del AFG o lisosomas con los sistema de anclaje o con la maquinaria de fusión como son los **SNAREs** (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein receptor*)⁷⁹.

Una vez se ha formado el AFG, en la membrana externa del mismo, se localiza una Q_a-SNARE, la sintaxina 17 (Stx17)⁸⁰. Stx17 es capaz de interactuar con una Q_{bc}-SNARE, la SNAP29 (*synaptosome associated protein 29*) y con la R-SNARE endosomal/lisosomal VAMP8 (*vesicle associated membrane protein 8*), formando el complejo trans-SNARE, el cual modula la fusión entre el AFG y el lisosoma^{81, 82}. Además, se ha descrito que Atg14 se une a Stx17 promoviendo la estabilidad del complejo Stx17-SNAP29 en la membrana del AFG para posteriormente llevar a cabo la etapa de fusión^{83, 84}. Por otro lado, el principal factor de anclaje es el complejo HOPS, formado por VPS11 (*vacuolar protein sorting 11*), Vps16, VPS18, Vps33A, VPS39 y Vps41⁴⁸. Este complejo actúa de forma específica para los eventos de fusión tanto en levaduras como mamíferos, interactuando con Stx17⁷⁶. Esta interacción entre Stx17 y HOPS tiene lugar específicamente en los AFG⁴⁸. Además, el complejo HOPS también puede interactuar con la GTPasa Rab7, localizada en la membrana del lisosoma, regulando la fusión entre AFG y lisosoma⁸⁵.

Gracias a la actividad lítica que tiene el lisosoma, se lleva a cabo la degradación de la membrana interna del AFG, quedando expuesto, de esta forma, el contenido a degradar⁸⁶.

Finalmente, los **autofagolisosomas** no son estructuras permanentes y se desintegran una vez que finaliza la autofagia. El paso de terminación de la autofagia es un proceso denominado ALR (*autophagy lysosome reformation*). Durante la ALR, las proteínas de la membrana lisosómica se reciclan de los AFGL a través de estructuras tubulares llamadas túbulos de reforma⁸⁷.

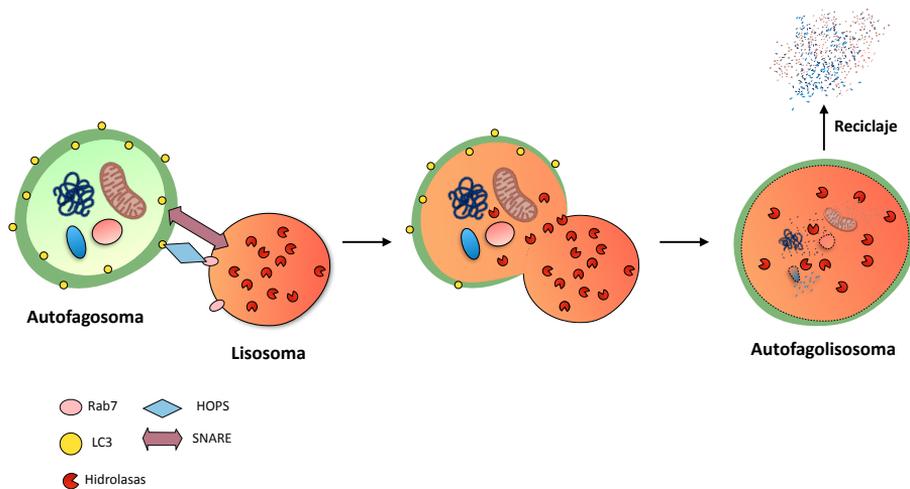


Figura 4. Esquema del proceso de fusión entre el autofagosoma y el lisosoma. Una vez se produce la fusión, las enzimas líticas del lisosoma llevan a cabo la degradación del contenido y se produce el reciclaje de este.

2. Implicación de autofagia en enfermedades del Sistema Nervioso Central

2.1. Autofagia en Neuronas

El proceso de autofagia presenta un papel fundamental en células neuronales. Debido a su naturaleza postmitótica, son células incapaces de diluir los agregados proteicos u orgánulos disfuncionales por división celular⁸⁸. Por ello, la eliminación de agregados proteicos mediante el proceso de autofagia adquiere un papel especialmente importante para el mantenimiento de la homeostasis neuronal, así como para su supervivencia⁸⁹.

2.2. Autofagia y enfermedades neurodegenerativas

Un mal funcionamiento de autofagia en el Sistema Nervioso Central (SNC) lleva a la acumulación de agregados proteicos, disfunción celular y neurodegeneración. La mayoría de las enfermedades lisosomales afectan gravemente al cerebro⁹⁰ y la supresión genética de autofagia en animales resulta en severas alteraciones neurológicas y defectos en el comportamiento, poniendo de manifiesto la relevancia de este proceso como mecanismo de control de calidad en el SNC^{5, 91}.

Son muchas las evidencias que demuestran la relación entre el proceso de autofagia y enfermedades neurodegenerativas, tales como Alzheimer, Parkinson, Huntington o esclerosis lateral amiotrófica (ELA)^{13, 16, 92}.

La enfermedad de Alzheimer, es probablemente la enfermedad neurodegenerativa más común y se define por la pérdida progresiva de memoria así como por el deterioro de las funciones cognitivas⁹³. A nivel celular, esta enfermedad se caracteriza por una acumulación de placas amiloides en neuronas y un aumento del sistema endocítico-lisosómico, evidente incluso antes de los depósitos de placas amiloides⁹⁴. De modo que, en etapas tempranas de la enfermedad, existe un aumento del contenido

lisosomal, requerido para la posterior eliminación de agregados proteicos y tóxicos, activándose, al mismo tiempo, el proceso de autofagia. A medida que avanza la enfermedad, se observa una acumulación de AV, consecuentes de la disminución en la eficiencia de su degradación^{95, 96}. Sin embargo, la formación de estas AV no parece verse perjudicada, aumentando la posibilidad de que las alteraciones en autofagia puedan inducir la muerte celular en las neuronas afectadas^{13, 97}.

En el caso de la enfermedad de Parkinson, se caracteriza por la pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substantia nigra pars compacta* (SNpc), así como por la acumulación de inclusiones intracitoplasmáticas filamentosas, conocidas con el nombre de *cuerpos de Lewy*⁹⁸. Al igual que con Alzheimer, varios estudios sugieren la participación de la vía autofágica en la formación/eliminación de estas inclusiones. De hecho, el principal componente de los *cuerpos de Lewy*, α -sinucleína, es degradado tanto por macroautofagia como por CMA^{94, 99}. Por otro lado, una de las principales características en pacientes con Parkinson es la presencia de alteraciones mitocondriales, causando disfunción mitocondrial y consecuentemente muerte celular y neurodegeneración¹⁰⁰. La acumulación de mitocondrias dañadas a lo largo de la enfermedad, es consecuencia de un defecto en mitofagia, habiéndose descrito mutaciones en los genes *PINK1* y *PARKIN*, implicados en mitofagia, como causantes de la aparición de la enfermedad^{101, 102}.

El síndrome de Huntington, al igual que en los casos anteriores, muestra la acumulación de agregados intracelulares en neuronas y un aumento de autofagia, con el fin de inducir muerte celular. Sin embargo, en este caso, los AFG se forman con normalidad e incluso se fusionan con los lisosomas, sugiriendo por tanto un defecto en la degradación del contenido o en el reconocimiento y selección del mismo¹⁰³. Por último, se ha propuesto que la disminución de la actividad autofágica, dependiente de la edad, promueve la progresión de esta enfermedad¹⁰⁴.

Finalmente, ELA es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a las neuronas motoras. Una característica patológica de esta enfermedad es la acumulación de agregados proteicos en dichas motoneuronas. La presencia de estos agregados en las neuronas durante un largo período de tiempo, por alteraciones en autofagia, contribuyen a su citotoxicidad¹⁰². En este sentido, mutaciones en el gen que codifica para la proteína p62/SQSTM1 están relacionados con esta enfermedad^{105, 106}, así como mutaciones de varias proteínas que se encuentran implicadas en mitofagia¹⁰⁷.

En definitiva, autofagia, como sistema de reciclaje de componentes celulares, y su relevancia en el correcto desarrollo y funcionamiento del SNC ha hecho que se plantee su regulación como posible diana terapéutica para el tratamiento de distintas patologías neurodegenerativas^{106, 108, 109}.

3. Papel del citoesqueleto de actina en autofagia

La dinámica del citoesqueleto de actina presenta un papel esencial en diversos procesos celulares, relacionados con la contracción muscular y la movilidad celular¹¹⁰. También participa en la deformación de membrana, señalización celular, así como en el mantenimiento de las uniones celulares, en el ciclo celular, la muerte celular y en la fagocitosis, la endocitosis y la citocinesis^{111, 112}.

Puesto que el proceso de autofagia requiere el remodelado de la membrana para generar AV, así como su fusión con los lisosomas, estudios recientes han demostrado la participación de diferentes componentes del citoesqueleto, incluyendo actina, en la biogénesis y tráfico de los AFG^{113, 114} (**Figura 5**). Así, se ha observado la co-localización de actina con otras proteínas implicadas en la etapa de iniciación y formación del omegasoma. Concretamente, la polimerización de actina es esencial para la formación de

los AFG durante las primeras etapas, ya que, ante una situación de inducción de autofagia, como es el tratamiento con rapamicina o la ausencia de nutrientes, la despolimerización de actina provoca una disminución en los niveles de LC3-II¹¹⁵.

El complejo Arp2/3, altamente conservado a través de todos los eucariotas, actúa como nucleador de la ramificación de los filamentos de actina¹¹⁶. La inhibición de este complejo lleva a una disminución del número de AFG, así como a la acumulación de estructuras tubulares alargadas, positivas para DFCP1 y LC3 (presentes en etapas iniciales de la biogénesis del AFG), indicando una posible alteración en la formación del omegasoma¹¹⁴. Existen diferentes factores que regulan la actividad del complejo Arp2/3 (NPFs), promoviendo la nucleación y ramificación de actina en diferentes localizaciones subcelulares. Entre ellos, encontramos tres que han sido relacionados con el proceso de autofagia: el homólogo de WASP asociado a actina, membranas y microtúbulos (**WHAMM**)^{117, 118}, la proteína reguladora y mediadora de uniones (**JMY**)¹¹⁹ y el complejo homólogo de la familia de proteínas WAS (**WASH**)¹²⁰.

WHAMM, se encuentra en regiones del RE ricas en PI(3)P, co-localizando con marcadores específicos de zonas de formación del omegasoma, tales como DFCP1¹¹⁸. Además, el silenciamiento de WHAMM resulta en una disminución de la formación de los AFG y una disminución en su tamaño¹¹⁷, así como en la eliminación casi completa de la formación de colas de cometa de actina (dependiente de Arp2/3), las cuales están implicadas en el impulso del aislamiento de membrana por parte del omegasoma, para su posterior elongación y maduración^{113, 118}.

JMY presenta una región LIR a través de la cual se asocia a AFG. Al bloquear la interacción entre JMY y el complejo Arp2/3 se produce la inhibición de la formación del AFG, indicando que JMY regula el proceso de autofagia a través de su actividad sobre la nucleación de actina¹¹⁹.

Por otro lado, se ha observado que WASH co-localiza con algunos marcadores de AFG (Atg5, p62 y LC3), pero no con AFGL, sugiriendo su papel en etapas tempranas del proceso¹¹³. La deficiencia del complejo WASH causa una acumulación de Atg9 en Golgi y la pérdida de LC3-II, indicando un defecto en el transporte de membranas marcadas con Atg9 para la expansión del fagoforo¹¹⁴. Por otra parte, el tráfico de vesículas dependientes de Atg9 durante la expansión del fagoforo es regulado por miosina II, proteína motora basada en actina¹²¹. Y también se ha observado la implicación de la miosina VI en el reconocimiento del sustrato a degradar, así como en la etapa de fusión¹²².

Además, tal y como se ha explicado en el apartado anterior, se ha demostrado que otros componentes del citoesqueleto de actina, tales como los microtúbulos o el complejo dineína-dinactina, están implicados en el movimiento de los AFG a través del citoplasma^{71, 72}.

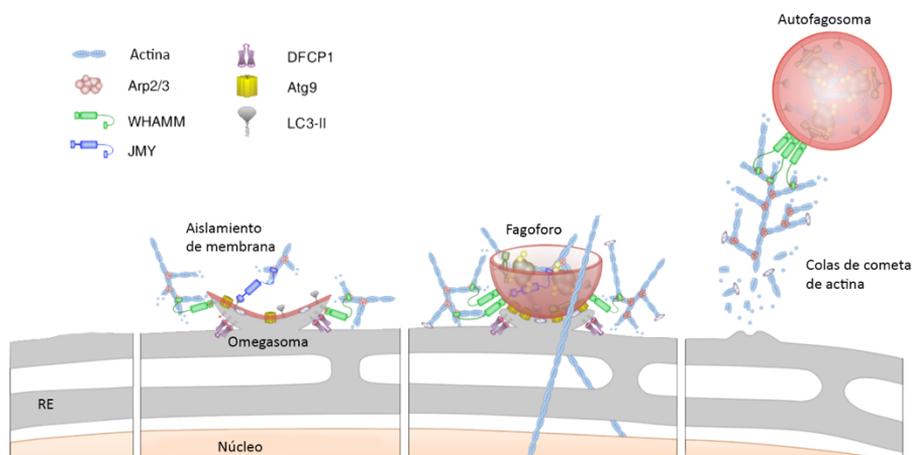


Figura 5. Participación del citoesqueleto de actina durante las primeras etapas del proceso de autofagia. Actina, así como el complejo Arp2/3 (encargado de la nucleación de actina) y sus factores de activación (WHAMM y JMY), presentan un papel esencial durante la formación del fagoforo, así como en su elongación y posterior cierre de la membrana. Modificada de Kast y Dominguez, 2017¹¹³.

Finalmente, para que tenga lugar la fusión entre el AFG y el lisosoma, es necesario el reclutamiento de cortactina a los sitios de fusión por la HDAC6 (histona desacetilasa-6)⁶. Cortactina es un estabilizador de las ramificaciones de los filamentos de actina formado por el complejo Arp2/3, de modo que el complejo Arp2/3 también parece estar implicado en la etapa de fusión¹²³.

Otro componente muy importante en el proceso de fusión es el colesterol, siendo una miosina monomérica de clase I, miosina IC, la que lleva a cabo el transporte de balsas lipídicas ricas en esfingolípidos y colesterol desde el trans-Golgi hasta la membrana plasmática⁷³. Por tanto, una disminución de miosina IC provoca la acumulación de AFG. Por último, anexina A5 se acumula sobre la membrana lisosomal y su silenciamiento provoca una disminución en el reciclaje de LC3, sugiriendo por tanto, su implicación en la última etapa del proceso de autofagia (fusión)¹¹³.

4. Familia de proteínas Rho

La familia de proteínas Rho (**homólogas a Ras**) constituye uno de los cinco grupos de la superfamilia Ras¹²⁴. Este grupo de proteínas se encuentra altamente conservado y está formado por pequeñas proteínas monoméricas con actividad GTPasa intrínseca, implicadas en una amplia variedad de funciones celulares, aunque, clásicamente, se les ha asignado un papel casi exclusivo en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina¹²⁵⁻¹²⁸.

En mamíferos, se ha descrito que la familia Rho está constituida por más de 20 miembros, siendo RhoA, Rac1 y Cdc42 los más caracterizados. De acuerdo con sus propiedades bioquímicas y funcionales, han sido clasificados en ocho subfamilias diferentes, que, al mismo tiempo, pueden dividirse en dos grupos dependiendo de cómo están regulados: proteínas Rho clásicas y atípicas (**Figura 6**)¹²⁸. Finalmente, algunos autores han descrito una novena

subfamilia de proteínas Rho, las proteínas Miro (*mitochondrial Rho protein*), implicadas en la regulación del tráfico y distribución de mitocondrias a través de las vías de transporte de microtúbulos dependientes de kinesina y dineína¹²⁹.

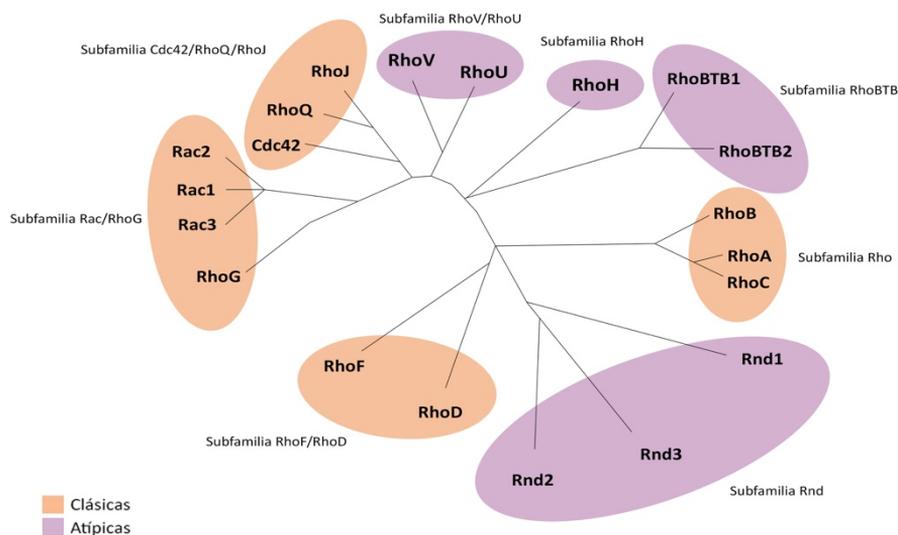


Figura 6. Clasificación de la familia de proteínas Rho. De acuerdo con sus propiedades bioquímicas y funcionales, se clasifican en 8 subfamilias. Modificada de Haga y Ridley, 2016¹²⁸.

Las proteínas Rho clásicas ciclan entre un estado activo, unido a GTP, y un estado inactivo, unido a GDP. El cambio de un estado conformacional al otro es regulado por varios mecanismos (**Figura 7**): las proteínas Rho-GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*), que facilitan la unión a GTP y por tanto llevan a cabo su activación¹³⁰; las proteínas Rho-GAPs (*Rho GTPase activating protein*), encargadas de activar la actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho, hidrolizando el GTP a GDP y volviendo, por tanto, a su estado inactivo¹³¹; y, por último las proteínas Rho-GDIs (*Rho GDP-dissociation inhibitor*), que secuestran a las proteínas Rho en el citoplasma, alejadas de la membrana, e impiden su unión a GTP, evitando de esta forma que puedan ejercer su función¹³². Las proteínas Rho inactivas se encuentran principalmente distribuidas por el citoplasma, mientras que las que se

encuentran en un estado activo presentan su localización en la membrana plasmática o en membranas de compartimentos intracelulares donde ejercen su función^{128, 133, 134}.

Por otro lado, las proteínas Rho atípicas, tales como la subfamilia Rnd, presentan sustituciones de aminoácidos importantes para la actividad GTPasa, de modo que carecen de esta actividad, permaneciendo en un estado constitutivamente activo. No hay evidencias de la regulación de las proteínas Rho atípicas a través de GEFs o GAPs^{135, 136}. Sin embargo, existen evidencias de otros mecanismos para su regulación, incluyendo modificaciones post-traduccionales, regulación de la expresión génica, así como su degradación a través del proteasoma, o la interacción con otras proteínas^{125, 137, 138}.

La mayoría de las proteínas Rho se someten a modificaciones post-traduccionales en el motivo CAAX situado en la región C-terminal, donde C es una cisteína, A un aminoácido alifático y X cualquier aminoácido. Este motivo puede ser prenilado por un lípido isoprenoide (farnesilo o genarilgenarilo), facilitando su localización en membrana y permitiendo por tanto ejercer su función¹³⁹. Además, se ha descrito que, en muchos casos, las proteínas Rho pueden ser fosforiladas, convirtiéndose en un nivel adicional de regulación de estas proteínas^{128, 140}.

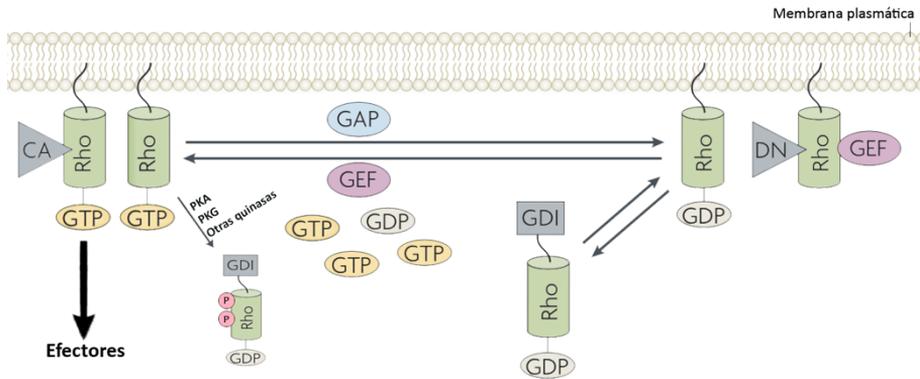


Figura 7. Esquema del mecanismo de regulación de las proteínas de la familia Rho. Las proteínas Rho clásicas ciclan entre un estado activo, unido a GTP, y un estado inactivo, unido a GDP. Las proteínas GEFs facilitan la unión a GTP, mientras que las GAPs activan la actividad GTPasa la cual hidroliza el GTP a GDP, inactivándolas. Las proteínas GDIs sequestran a las proteínas Rho, unidas a GDP, en el citoplasma. Modificada de Heasman, 2008¹¹².

4.1. Proteínas Rho y su función en el citoesqueleto de actina

Las proteínas Rho, una vez se localizan en membrana, donde se encuentran activas, interactúan selectivamente con sus efectores, incluyendo proteínas de andamiaje¹⁴¹. Las proteínas Rho median una gran variedad de procesos celulares relacionados con la reorganización del citoesqueleto de actina, tales como la regulación del tráfico de membranas, la motilidad celular y la polaridad celular¹⁴². Tal y como se ha comentado anteriormente, las proteínas Rho mejor caracterizadas son RhoA, Rac1 y Cdc42, implicadas en el ensamblaje y la organización de los filamentos de actina. Concretamente, RhoA participa en el ensamblaje de los filamentos de actina y miosina (fibras de estrés y adhesiones focales)¹⁴³, mientras que Rac1 y Cdc42 participan en la formación de protuberancias ricas en actina situadas en la membrana celular llamadas lamelipodios y filopodios, respectivamente^{111, 127, 144-146}.

A nivel molecular se han descrito diversas rutas implicadas en el proceso de regulación de la polimerización de actina mediada por proteínas Rho (**Figura 8**).

En primer lugar, la forma activa de RhoA es capaz de unirse a numerosas proteínas, entre las que se encuentran una serie de proteínas con actividad serina/treonina kinasa de la familia ROCK (*Rho-associated protein kinase*)¹⁴⁷. La interacción de RhoA con estas proteínas aumenta su actividad kinasa, promoviendo la fosforilación de sus efectores. La activación de ROCK lleva a cabo la fosforilación e inactivación de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP, *myosin light chain phosphatase*), promoviendo la fosforilación de la miosina y produciendo un aumento en los filamentos contráctiles actina-miosina¹²⁷.

En el caso de Cdc42, este interacciona directamente con WASP activando el complejo Arp2/3 que promueve la polimerización y la ramificación de los filamentos de actina¹⁴⁸. Además, Cdc42 es capaz de activar a PAK-1 (*p21 activated kinase*), la cual puede fosforilar a MLC, produciendo, por tanto, un fenotipo similar al que produce RhoA sobre la formación de fibras de estrés de actina¹⁴⁹.

Por último, Rac1 activa de forma indirecta a WAVE, promoviendo también la activación del complejo Arp2/3¹⁵⁰. Al igual que ocurre con Cdc42, Rac es capaz de fosforilar a MLC a través de la activación de PAK-1¹⁵¹.

En resumen, RhoA, Rac1 y Cdc42, a través de sus efectores ROCK y PAK-1, producen la fosforilación de MLC resultando en una reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de fibras de estrés.

Por otro lado, las proteínas Rho pueden regular la polimerización de actina a través de la regulación de cofilina, un factor que despolimeriza y desestabiliza los filamentos de actina. Rac1/Cdc42 activan a PAK, que a su vez fosforila y activa a las kinasas LIM (LIMK), las cuales fosforilan a cofilina y la inactivan. Finalmente, también ROCK es capaz de fosforilar y activar a las LIMKs ^{111, 146}.

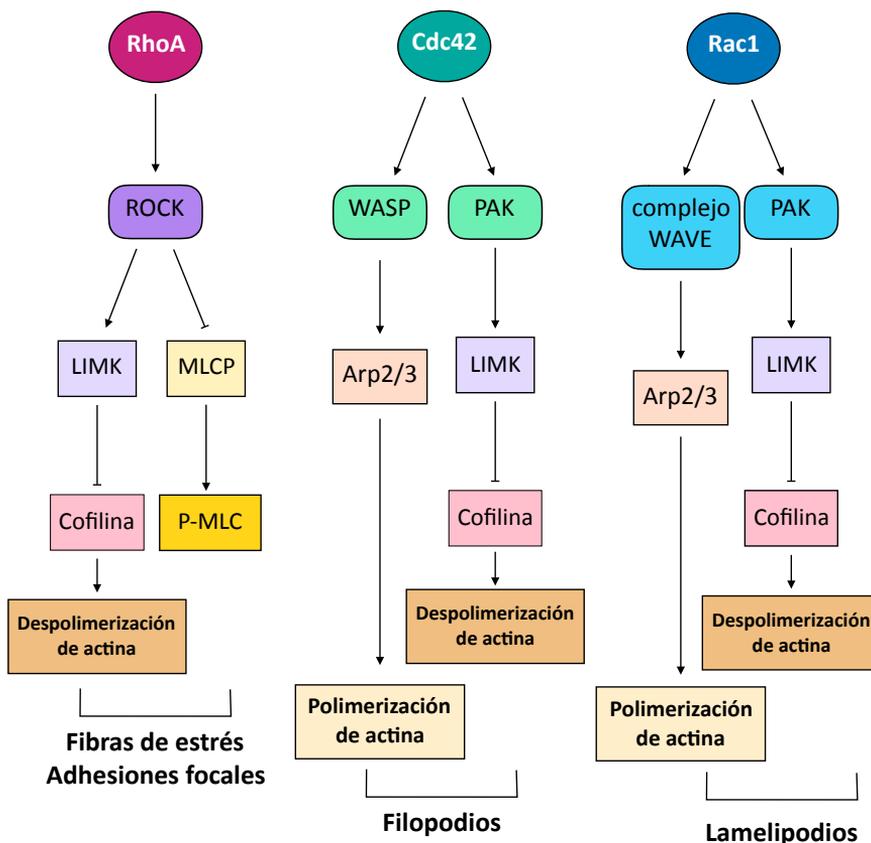


Figura 8. Vías de señalización implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina a través de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42, implicados en la formación de las fibras de estrés y adhesiones focales, así como en la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente.

4.2. Implicación de proteínas Rho en el proceso de autofagia

En la última década se ha descrito la participación del citoesqueleto de actina en el proceso de autofagia. Sin embargo, el mecanismo a través del cual la actina participa en autofagia, así como la contribución de las proteínas Rho en este proceso, aún no está claro.

Una de las proteínas Rho identificadas en la regulación del proceso de autofagia ha sido Rac3. Así, se ha descrito que la expresión de esta proteína

está inversamente relacionada con los niveles de autofagia. El silenciamiento de Rac3 produce una inducción de los niveles de LC3-II en líneas celulares (PC3, HeLa o HCT116), mientras que su sobreexpresión provoca una disminución de los niveles de LC3-II en condiciones basales, confirmando el papel negativo de Rac3 en el proceso de autofagia¹⁵². Del mismo modo que Rac3, también se ha descrito un efecto inhibitorio de Rac1 en la inducción de autofagia por estrés nutricional. La sobreexpresión de la forma activa de Rac1 inhibe el aumento en los niveles de LC3 ante una situación de estrés nutricional, mientras que la sobreexpresión de su forma inactiva, así como el silenciamiento de Rac1, es suficiente para aumentar los niveles de LC3 en presencia de suero, lo que sugiere un papel regulador de autofagia, al menos en condiciones basales¹¹⁵. Por otro lado, a Rac1 también se le ha atribuido un papel regulador en CMA, ya que durante una situación de estrés aumentan sus niveles en lisosomas purificados y activos para CMA¹⁵³.

La proteína RhoA también se ha relacionado con el proceso de autofagia, siendo en este caso un posible activador. Así, se ha descrito que la sobreexpresión de la forma activa de RhoA en condiciones basales, en células HeLa, incrementa los niveles de LC3, de la misma forma que se produce en células control en ausencia de suero. Además, la sobreexpresión de su forma inactiva, en ausencia de suero, produce una disminución de los niveles de LC3 respecto a las células control¹¹⁵. En resumen, la inducción de autofagia a través de un estrés nutricional como es la ausencia de suero requiere la presencia de la forma activa de RhoA.

ROCK-I, el efector principal de RhoA, también parece estar implicado en el proceso de autofagia, aunque su papel no está claro. En células HeLa, la inhibición de esta kinasa resulta en una disminución de los niveles de LC3, sugiriendo que su actividad es necesaria para que tenga lugar la inducción de autofagia¹¹⁵. Sin embargo, en presencia de RhoA activo, la inhibición de ROCK-I no disminuye los niveles de LC3, de modo que otros efectores de RhoA pueden estar implicados. Por otra parte, estudios realizados con células

HEK293 han demostrado un papel negativo de ROCK-I en el proceso de autofagia, ya que la inhibición de ROCK-I, así como su silenciamiento, promueven la formación de partículas autofágicas. Además, sugieren que las partículas autofágicas formadas tras la inhibición de ROCK-I no son iguales a las que se forman en células control, sugiriendo el papel de ROCK-I en el control del tamaño y la densidad de los AFG¹⁵⁴. Finalmente, otros autores han demostrado en células Hela que ROCK-I puede fosforilar a Beclin1 permitiendo su disociación de la proteína Bcl2, e induciendo, por tanto, el proceso de autofagia en condiciones de estrés nutricional¹⁵⁵. Todos estos resultados indican que la regulación de ROCK-I en autofagia probablemente es dependiente del contexto y/o tipo celular.

5. Proteínas Rnd

Las proteínas Rnd (*round*) constituyen una de las subfamilias de las proteínas Rho atípicas. Dentro de este subgrupo encontramos tres proteínas: Rnd1/Rho6, Rnd2/Rho7 y Rnd3/Rho8/RhoE, las cuales se caracterizan por carecer de actividad GTPasa intrínseca así como por su baja afinidad a GDP, permaneciendo, por tanto, en un estado constitutivamente activo¹³⁵. Como consecuencia, existen otros mecanismos encargados de regular su actividad, como son su localización en la célula, o su degradación a través del proteasoma^{125, 136, 138, 156}.

Del mismo modo que las proteínas Rho, a las proteínas Rnd se les ha asignado un papel fundamental en la regulación del citoesqueleto de actina en diferentes tejidos. De hecho, como resultado de la sobreexpresión de estas proteínas se produce la inhibición de la formación de las fibras de estrés así como de las adhesiones focales resultando en un fenotipo redondeado, motivo por el cual estas proteínas reciben su nombre, **Round**^{135, 156-158}. No

obstante, además de la re-organización del citoesqueleto, a las proteínas Rnd se les ha asignado un papel importante en otros procesos celulares, tales como la regulación del ciclo celular, transformación, migración, guía axonal, desarrollo o cáncer^{138, 159-163}.

A diferencia de otros miembros de la familia Rho, las proteínas Rnd solo se han encontrado en animales vertebrados (mamíferos, aves, anfibios y peces), lo que podría indicar una posible relación con funciones más sofisticadas del citoesqueleto como, por ejemplo, el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso y la plasticidad neuronal^{135, 160, 164}.

5.1. Rnd3

Dentro de la subfamilia Rnd, la mejor caracterizada es Rnd3, siendo su principal función la de reorganizar el citoesqueleto de actina de manera antagónica a RhoA (**Figura 9**). Esta función la lleva a cabo a través de tres mecanismos diferentes: por un lado Rnd3 es capaz de unirse y activar a p190GAP y reducir, por tanto, los niveles de RhoA-GTP^{165, 166}; por otro lado, Rnd3 también puede actuar de forma antagónica a RhoA, uniéndose y regulando negativamente a Syx, una GEF responsable de la activación de RhoA^{156, 167}; finalmente, Rnd3 es capaz de inhibir la formación de las fibras de estrés y adhesiones focales es a través de su unión directa e inhibición de ROCK-I^{168, 169}. Así, la interacción entre Rnd3 y ROCK-I produce una menor fosforilación de MLC, implicada en la formación de las fibras de estrés. Además, Rnd3 y RhoA no pueden estar unidas al mismo tiempo a ROCK-I, de modo que cuando ROCK-I está unido a Rnd3 se produce un cambio conformacional que impide que se una RhoA^{168, 170-172}.

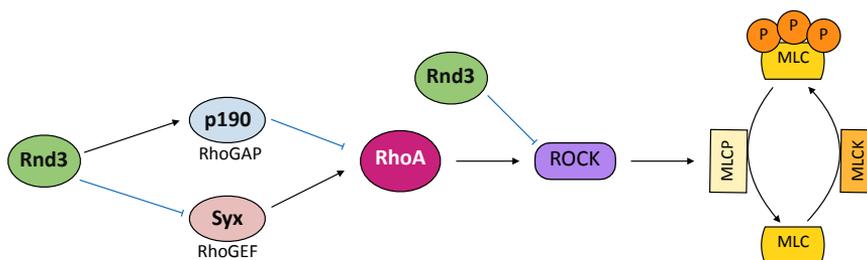


Figura 9. Esquema representativo del papel antagonista de Rnd3 sobre la vía de señalización RhoA-ROCK-I-MLC.

5.1.1. Función de Rnd3

Respecto a la función de Rnd3, se ha demostrado su implicación en procesos celulares como es la proliferación y transformación celular^{173, 174}, así como la supervivencia celular y la apoptosis¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. También se ha relacionado a Rnd3 con la transformación celular, habiendo autores que proponen su función como oncosupresor tumoral^{161, 178} mientras que otros estudios ponen de manifiesto el papel de Rnd3 como un oncogen^{179, 180}. De modo que, Rnd3 podría tener diferentes funciones dependiendo del contexto celular y/o el ambiente en el que se encuentra.

Por otro lado, en los últimos años, nuestro laboratorio y otros han demostrado la relevancia de la implicación de Rnd3 en el desarrollo del sistema nervioso. Rnd3 se expresa en cerebro, al igual que Rnd1 y Rnd2¹³⁵. Sin embargo, aunque la expresión de Rnd3 en cerebro es significativamente alta durante las primeras semanas de vida, su expresión se detecta ya en etapas embrionarias, disminuyendo gradualmente conforme se alcanza la edad adulta en ratones. En cuanto a su expresión dentro del SNC, se ha descrito una localización generalizada, siendo los niveles de expresión más altos en el bulbo olfatorio y la corteza¹⁵⁹. Por otro lado, la importancia de Rnd3 en el desarrollo del SNC se ha confirmado a través de la obtención de un modelo de ratón deficiente en Rnd3 (Rnd3^{gt/gt}). La caracterización de este

modelo animal ha demostrado un menor tamaño de los ratones $Rnd3^{gt/gt}$ y con una vida media que no supera las tres semanas de vida¹³⁷. A nivel del SNC, la ausencia de la expresión de Rnd3 produce un fenotipo caracterizado por graves alteraciones motoras y del desarrollo neural, acompañado de un retraso en el desarrollo de las sinapsis neuromusculares y un menor número de motoneuronas en la médula espinal, ausencia del nervio peroneo común y atrofia por denervación de los músculos diana de este nervio¹³⁷. Además, se ha descrito que la ausencia de Rnd3 disminuye el número y longitud de neuritas y retrasa la polarización de las neuronas hipocámpales a través de la vía RhoA-ROCK-LIMK-cofilina¹⁸¹.

Al igual que Rnd3 es importante para la migración de células epiteliales¹⁷⁰, así como para algunas líneas celulares tumorales^{136, 174}, también presenta un importante papel en la migración de neuronas corticales, debido a su participación en la regulación de la dinámica de los filamentos de actina en neuronas¹⁸² a través de la vía RhoA-ROCK-LIMK-cofilina¹⁶⁰, así como por su interacción con la plexina-B2¹⁸³. En nuestro laboratorio, también hemos descrito la importancia de Rnd3 en la correcta migración de las células a través de la corriente migratoria rostral (RMS), incrementando su número en la zona subventricular (SVZ) y observando que la diferenciación de las células en el bulbo olfatorio también se ve afectada¹⁸⁴. Por otro lado, otros resultados de nuestro grupo sugieren que Rnd3 puede desarrollar funciones importantes tanto en los procesos de mielinización axonal como de diferenciación de oligodendrocitos (Wenqi Han et. al. Manuscrito en revisión; Madrigal et. al. Manuscrito en preparación).

Finalmente, en neuronas procedentes de cortes de cerebros del ratón deficiente en Rnd3, hemos observado la presencia de algunos fenotipos subcelulares compatibles con alteraciones en el proceso de autofagia, tales como agregados proteicos, gotas lipídicas y mitocondrias morfológicamente aberrantes (**Figura 10**). La presencia de estos fenotipos subcelulares también ocurre en distintas enfermedades neurodegenerativas, tales como

Parkinson, Alzheimer o ELA, como consecuencia de un mal funcionamiento del proceso de autofagia.

Por este motivo, en este trabajo nos planteamos si los efectos pleiotrópicos que la ausencia de Rnd3 produce *in vivo* podrían ser debidos, en parte, a una desregulación del proceso de autofagia.

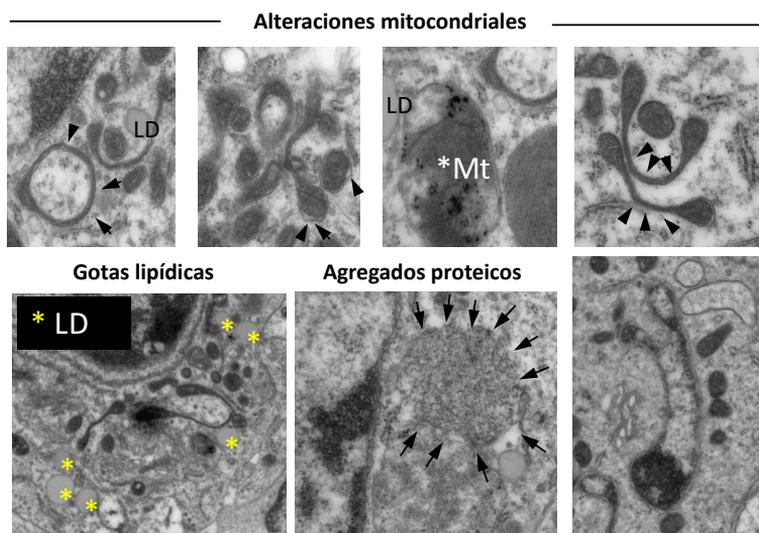
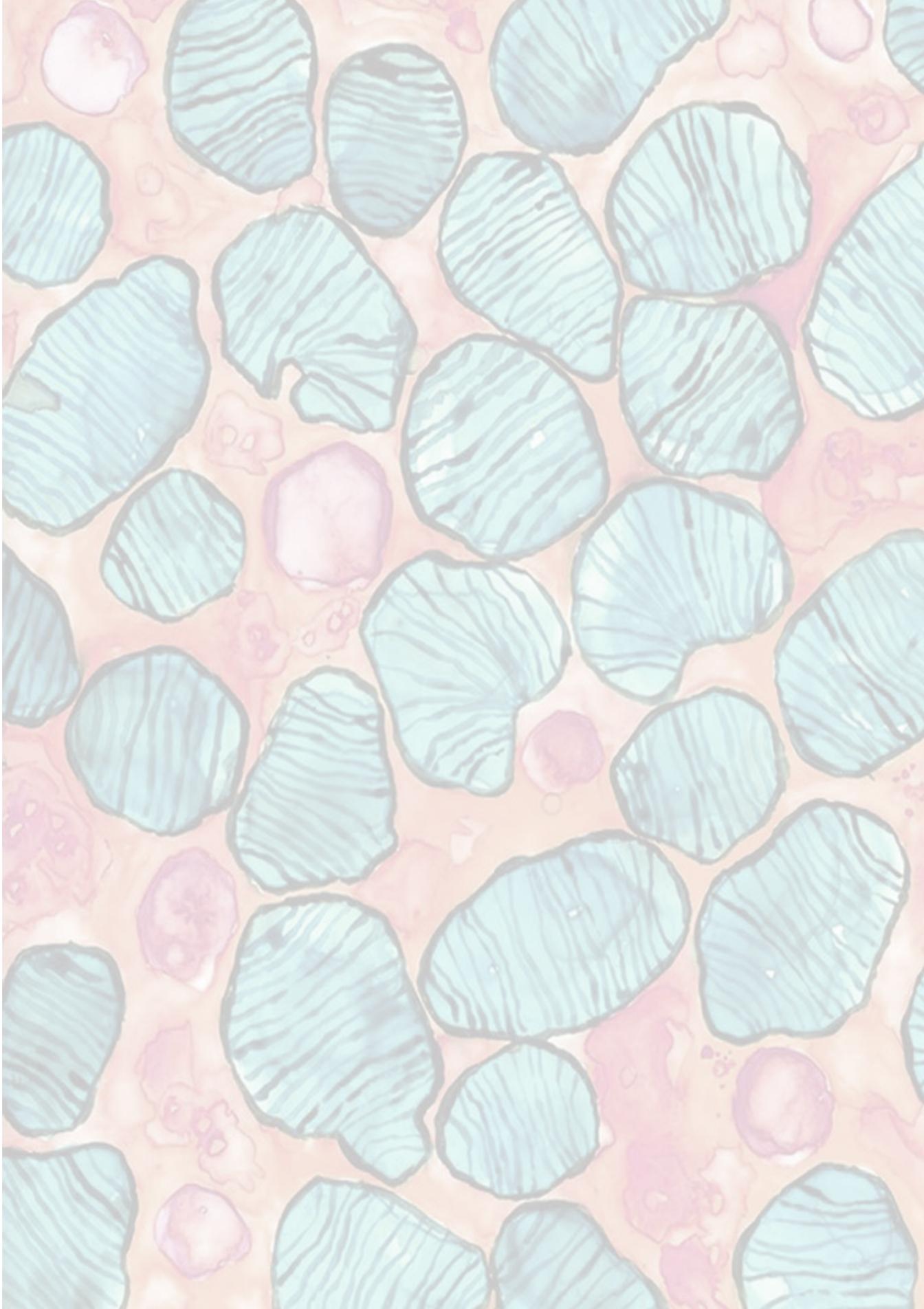
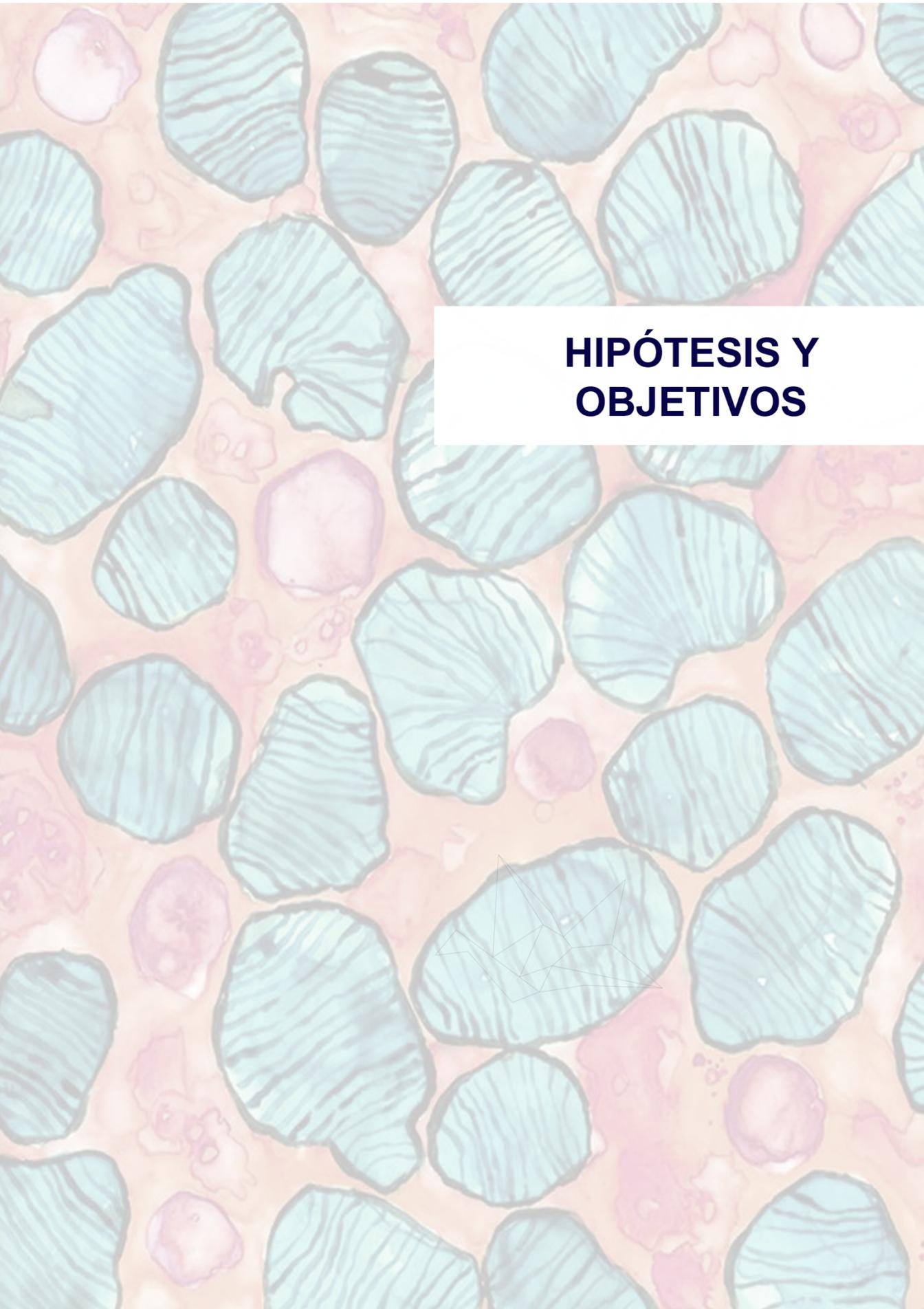


Figura 10. Imagen de microscopía electrónica a partir de cortes histológicos del cerebro de ratón $Rnd3^{gt/gt}$. Se observan fenotipos compatibles con una alteración en el proceso de autofagia (agregados proteicos, gotas lipídicas y mitocondrias aberrantes). LD: *lipid droplets*; Mt: mitocondria.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las proteínas Rho juegan un papel clave en varios aspectos del desarrollo neuronal y en la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas. En nuestro laboratorio disponemos de un modelo de ratón que no expresa la proteína Rnd3 ($Rnd3^{gt/gt}$) y que muestra una temprana letalidad postnatal, alteraciones motoras y neuromusculares, así como un fallo en la mielinización y en la formación de determinados tractos axonales. Todos estos datos demuestran la implicación de Rnd3 en el desarrollo del sistema nervioso. Además, resultados preliminares muestran alteraciones morfológicas subcelulares y la acumulación de mitocondrias aberrantes, compatibles con un mal funcionamiento del proceso de autofagia, lo que podría explicar el efecto pleiotrópico de la ausencia de expresión de Rnd3. Por todo ello, nos planteamos si Rnd3 estaría regulando el proceso de autofagia.

El objetivo general de este trabajo es **estudiar la implicación de la proteína Rnd3 en el proceso de autofagia y en la homeostasis mitocondrial.** Los objetivos específicos planteados son:

1. Analizar el papel de Rnd3 en la regulación del proceso de autofagia y en la formación y maduración de los autofagosomas.
2. Estudiar la ruta de señalización implicada en el proceso de autofagia en ausencia de Rnd3.
3. Estudiar la funcionalidad de las mitocondrias en ausencia de Rnd3.