

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

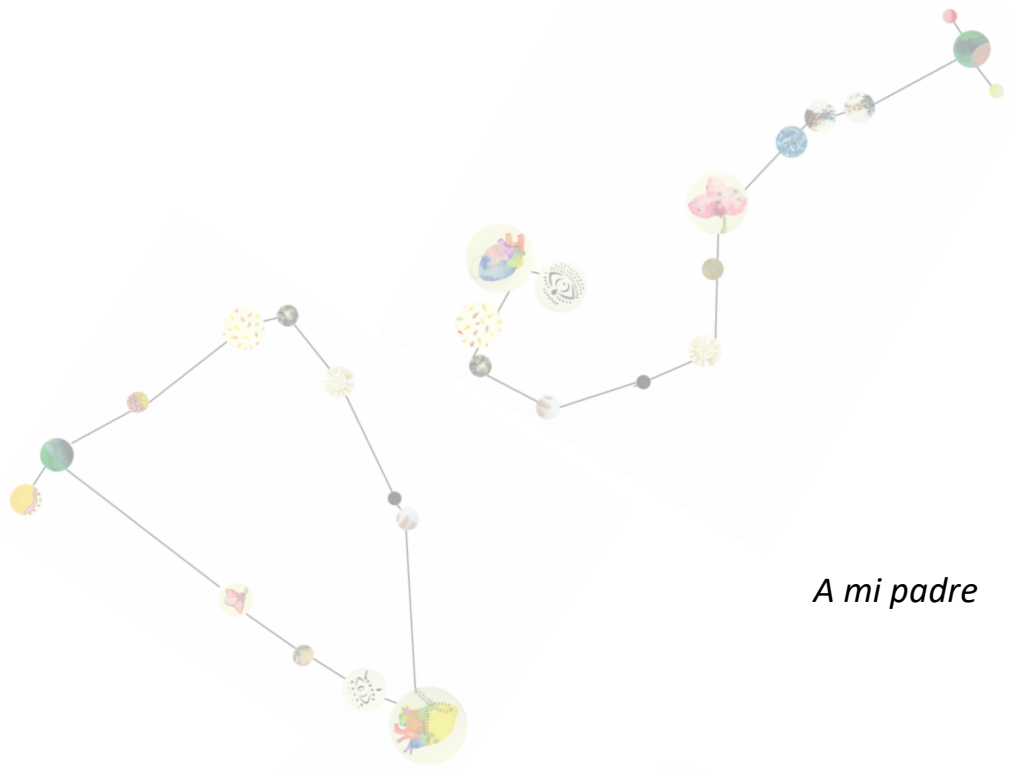
Dr. Enric Poch Jiménez

Dr. Ignacio Pérez Roger

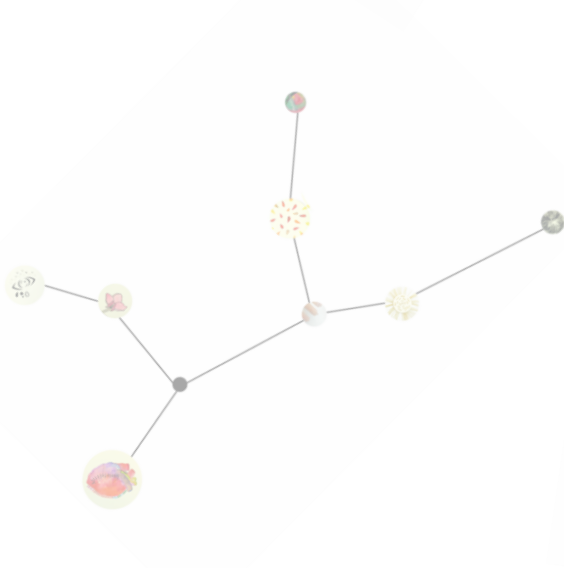
Este trabajo ha sido realizado con la financiación de Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2013-49176-C2-1-R), Generalitat Valenciana (AICO/2016/047) y gracias a un contrato predoctoral FPI-CEU de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y de la Generalitat Valenciana (ACIF16).

*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: *Ubiquitin-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}.

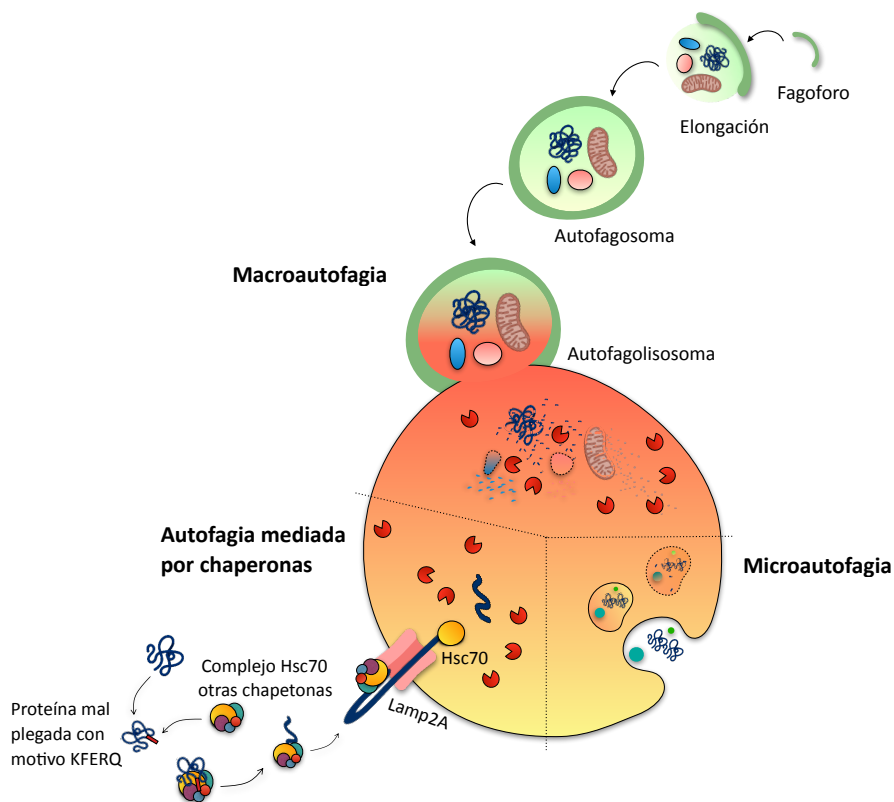


Figura 1. Principales tipos de autofagia. Macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA). Modificado de Martínez-Vicente, 2007¹³.

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.

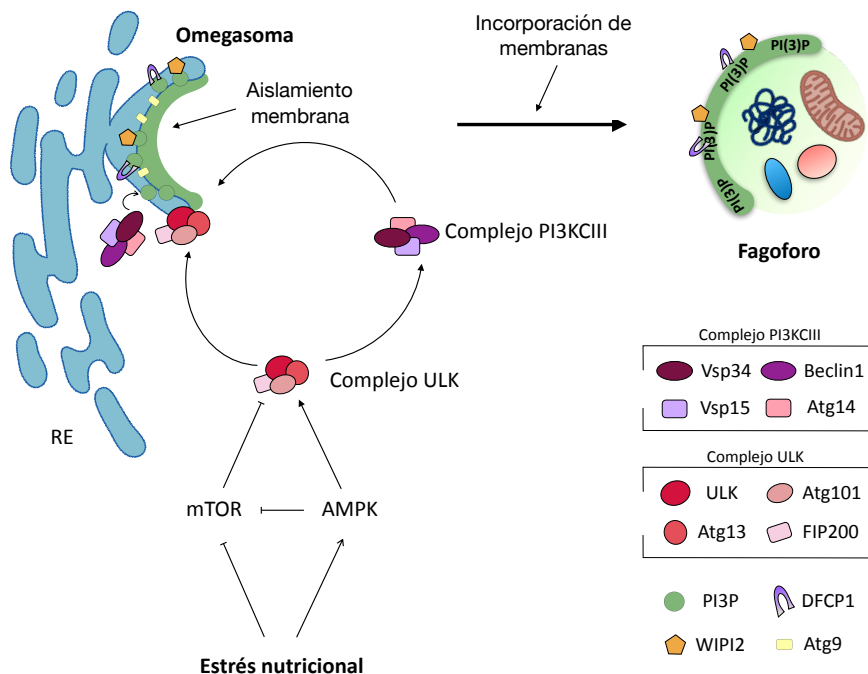


Figura 2. Esquema de la inducción e iniciación del proceso de autofagia. El proceso comienza con la formación de una estructura sobre el RE que recibe el nombre de **omegasoma**, a través del cual comienza el aislamiento de membrana (rica en PI(3)P) que da lugar a lo que se conoce con el nombre de **fagoforo** 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}.

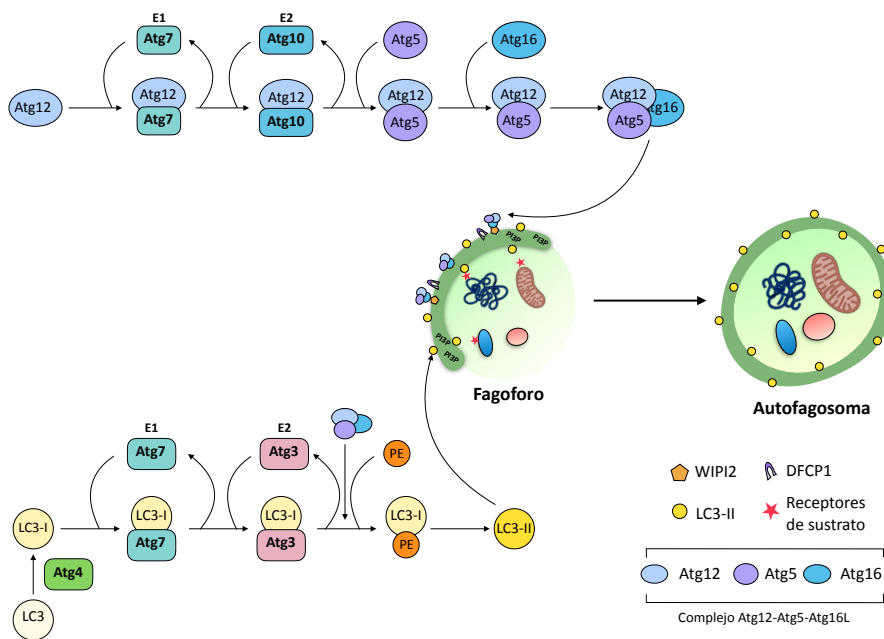


Figura 3. Esquema del proceso de elongación del fagoforo y formación del autofagosoma. En esta etapa intervienen dos sistemas UBL, permitiendo la formación del complejo Atg5-Atg12-Atg16L y el procesamiento de LC3 para dar lugar a LC3-II, principal marcador de autofagia. Además tiene lugar el reconocimiento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

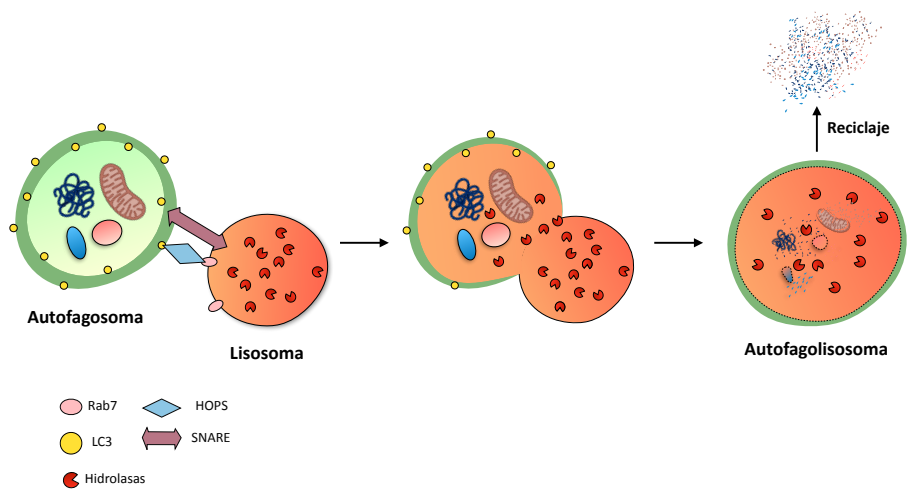


Figura 4. Esquema del proceso de fusión entre el autofagosoma y el lisosoma. Una vez se produce la fusión, las enzimas líticas del lisosoma llevan a cabo la degradación del contenido y se produce el reciclaje de este.

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}.

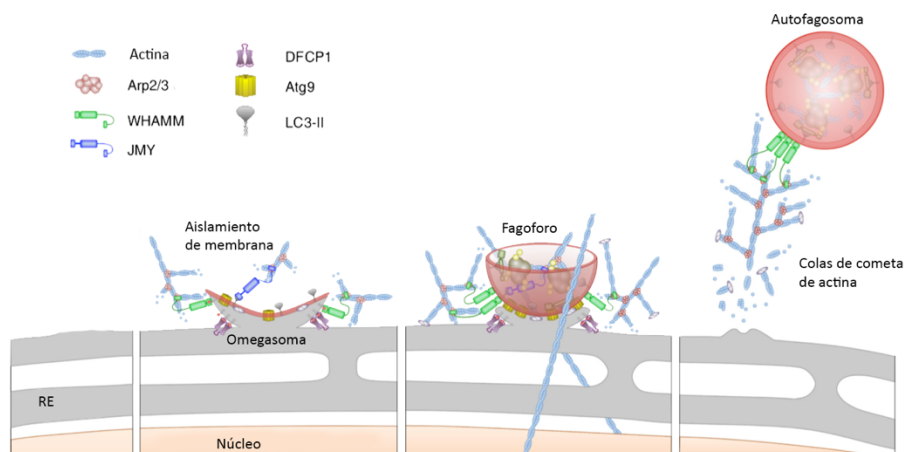


Figura 5. Participación del citoesqueleto de actina durante las primeras etapas del proceso de autofagia. Actina, así como el complejo Arp2/3 (encargado de la nucleación de actina) y sus factores de activación (WHAMM y JMY), presentan un papel esencial durante la formación del fagoforo, así como en su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

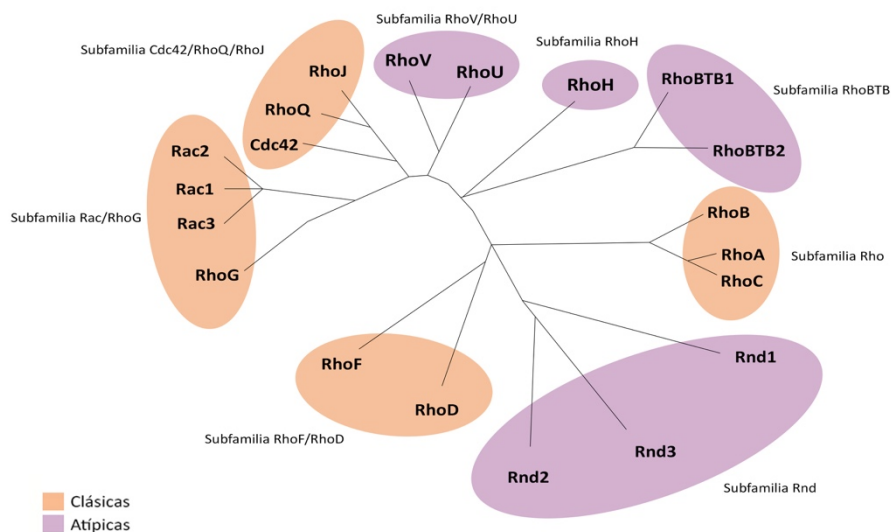


Figura 6. Clasificación de la familia de proteínas Rho. De acuerdo con sus propiedades bioquímicas y funcionales, se clasifican en 8 subfamilias. Modificada de Haga y Ridley, 2016¹²⁸.

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}.

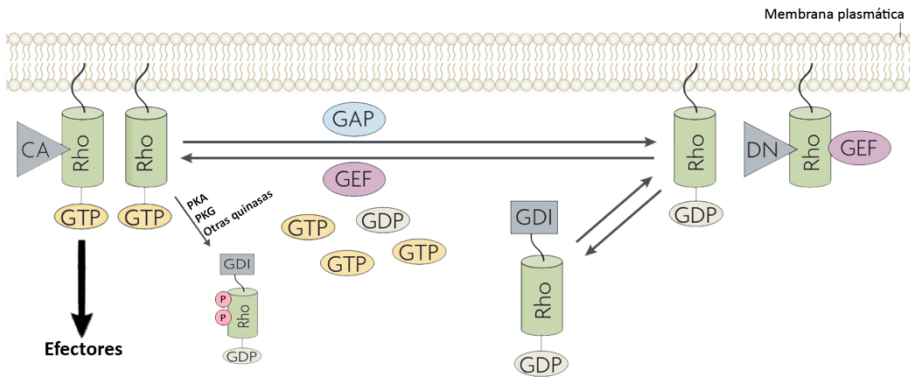


Figura 7. Esquema del mecanismo de regulación de las proteínas de la familia Rho. Las proteínas Rho clásicas ciclan entre un estado activo, unido a GTP, y un estado inactivo, unido a GDP. Las proteínas GEFs facilitan la unión a GTP, mientras que las GAPs activan la actividad GTPasa la cual hidroliza 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}.

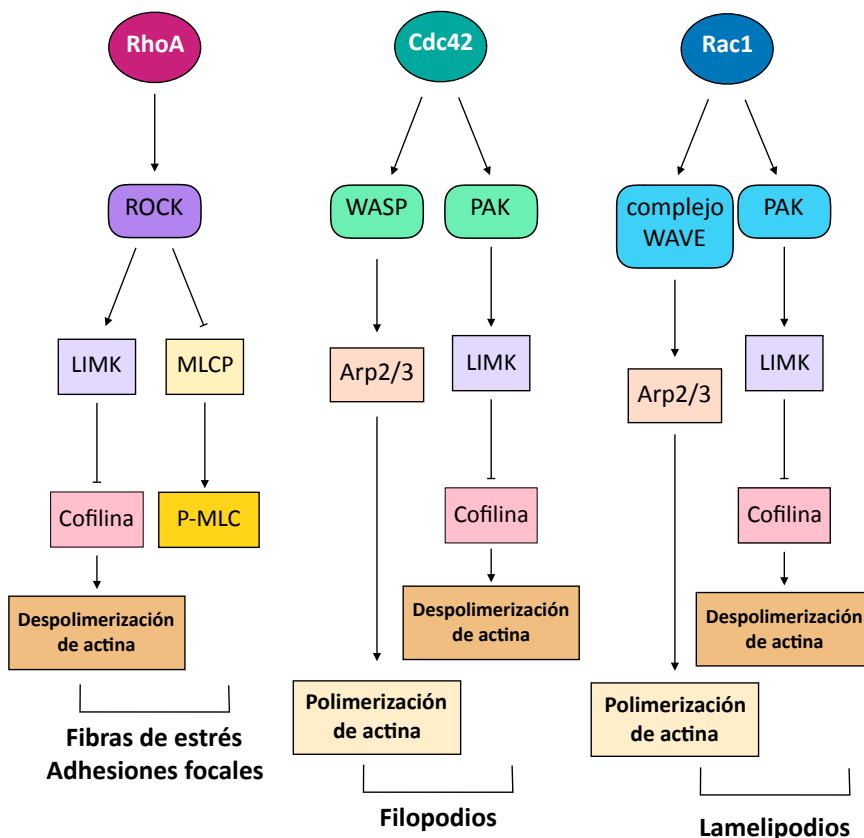


Figura 8. Vías de señalización implicadas en la regulación del citoesqueleto de actina a través de las proteínas RhoA, Rac1 y Cdc42, implicados en la formación de las fibras de estrés y adhesiones focales, así como en la formación de lamelipodios y filopodios, respectivamente.

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}.

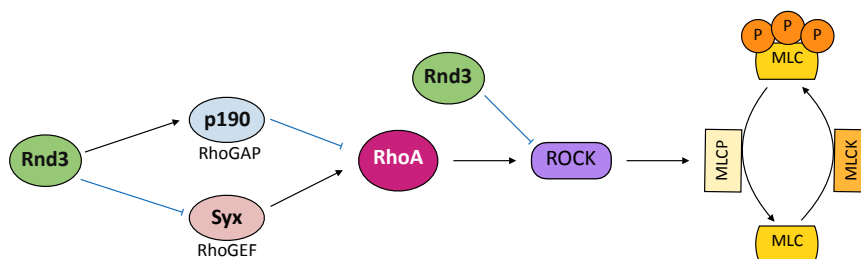


Figura 9. Esquema representativo del papel antagonista de Rnd3 sobre la vía de señalización RhoA-ROCK-I-MLC.

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.

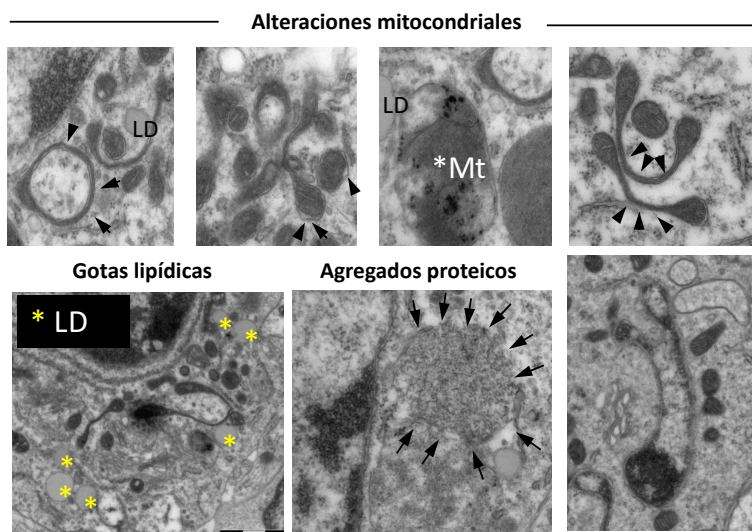
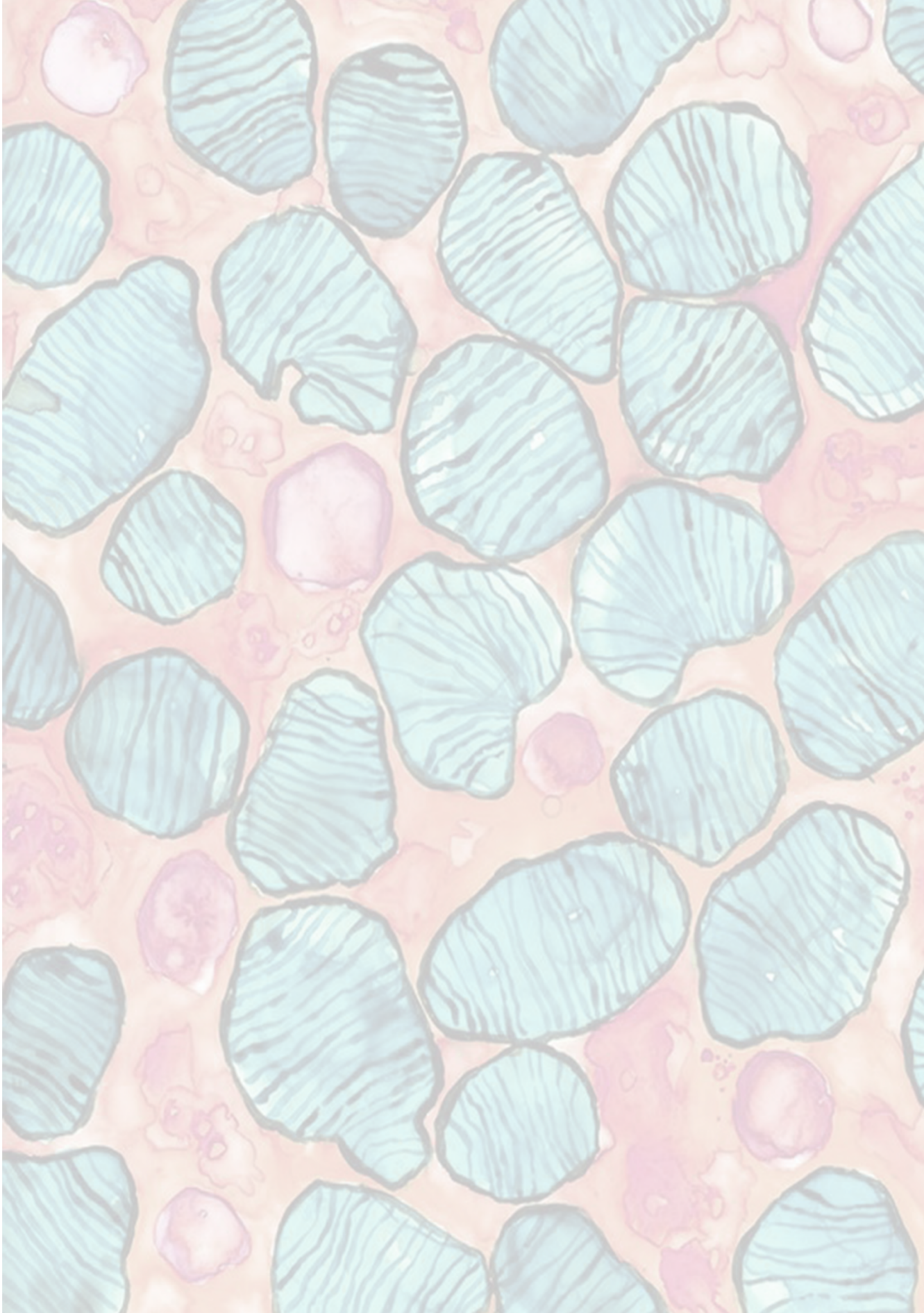


Figura 10. Imagen de microscopía electrónica a partir de cortes histológicos del cerebro de ratón $Rnd3^{gt/gt}$. Se observan fenotipos compatibles con una alteración en el proceso de autofagia (agregados proteicos, gotas lipídicas y mitocondrias aberrantes). LD: *lipid droplets*; Mt: mitocondria.



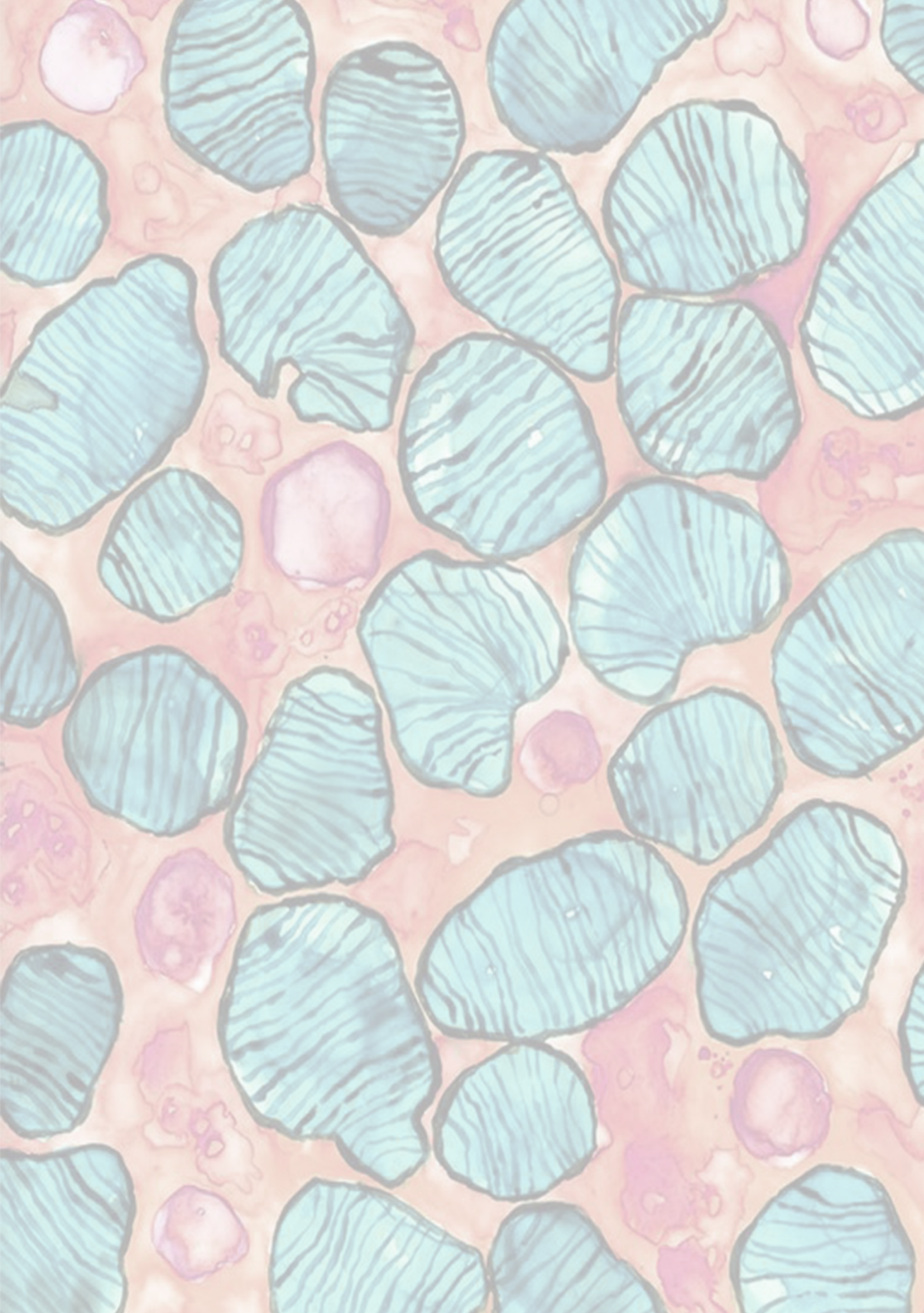


HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

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.



The background of the page is a microscopic image of tissue, likely stained with hematoxylin and eosin (H&E). It features numerous large, blue-stained cells with prominent, dark, wavy striations, characteristic of skeletal muscle fibers. Interspersed among these are smaller, pink-stained cells, possibly representing nuclei or other cellular components. A white rectangular box is positioned in the upper right quadrant, containing the title text. In the bottom left corner, there is a faint, light-colored geometric logo consisting of several interconnected lines forming a star-like or crystalline shape.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales

1.1. Estabulación

En este estudio se utilizaron ratones $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$ con un fondo genético mixto C57BL6/129, desarrollados por la empresa Lexicon Genetics (The Woodlans, TX, USA) mediante la técnica de *gene trapping*. Esta metodología consiste en eliminar la expresión de un gen (en este caso *RND3*) mediante la inserción por recombinación homóloga de un vector retroviral, dando lugar a un procesado aberrante del ARN mensajero (**Figura 11**). Como resultado, la síntesis de la proteína no se produce correctamente^{185, 186}, obteniendo así un modelo de ratón carente de la proteína $Rnd3$ ¹³⁷.

Los ratones se estabularon bajo condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 1^\circ\text{C}$), humedad (40-45%) y fotoperíodo de 12 horas de duración, teniendo libre acceso a agua y alimento.

La estabulación, el manejo, cuidado y sacrificio de los animales se realizaron de acuerdo con la legislación vigente en materia de protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos que se contempla en el Real Decreto 53/2013, y la Transposición de la Directiva Comunitaria Directiva 2010-63-UE. Todos los experimentos fueron autorizados por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad CEU-Cardenal Herrera (CEEA 16/023).

El sacrificio de los animales se realizó por luxación cervical. Tras el sacrificio se extrajeron inmediatamente las muestras de cerebros y se procesaron para su análisis por western blot.

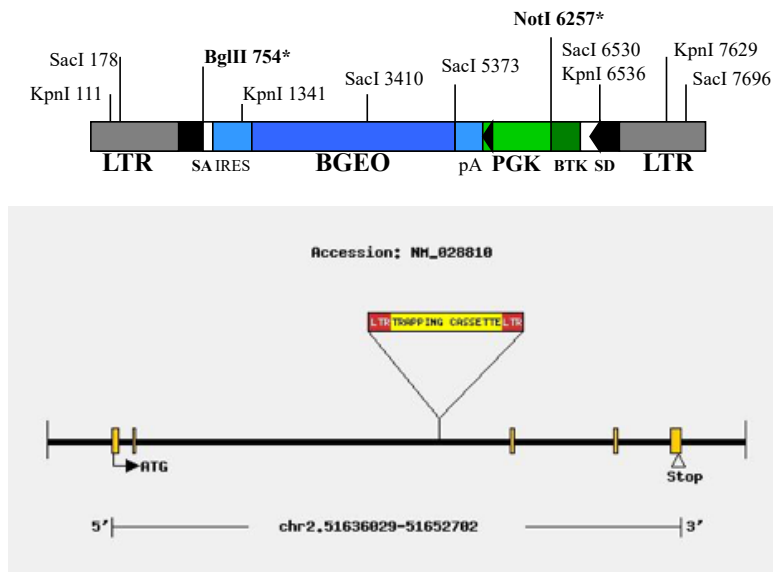


Figura 11. Resumen de la construcción del ratón $Rnd3^{gt/gt}$. Esquema del vector VICTR37 (figura superior) utilizado para interrumpir la expresión de *RND3*. En la parte inferior de la figura se indican las secuencias más relevantes del vector: LTR: Long Terminal Repeat; SA: Splicing Acceptor; IRES: Internal Ribosome Entry Site; BGEO: β -galactosidasa-Neomicina fosfotransferasa; pA: sitio de poliadenilación; PGK: promotor del gen de la fosfoglicerato-kinasa-1; BTK-SD: Splicing Donor de la tirosina kinasa de Bruton. En la figura inferior se indica el punto de inserción del vector en el segundo intrón del locus *RND3*.

1.2. Genotipado

Para la identificación del genotipo de los ratones se realizó la extracción del ADN genómico procedente un fragmento de la cola de los animales, de aproximadamente 3-5 mm. Posteriormente se llevó a cabo la amplificación del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando el Kit REExtract-N-AmpTM Tissue PCR (Sigma-Aldrich), tal y como se ha descrito previamente¹³⁷.

2. Líneas celulares

Las células empleadas en este trabajo fueron: fibroblastos embrionarios (MEFs) procedentes de ratones $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$, los cuales fueron inmortalizados a través del antígeno *large T* del virus SV40 (*Simian Virus 40*) y la línea celular de fibroblastos inmortalizados de ratón NIH3T3 (referidos a partir de ahora como 3T3), donde se eliminó la expresión del gen *RND3*, mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

El crecimiento de las líneas celulares se realizó en medio de cultivo DMEM (Thermo Fisher) suplementado con 10% de FBS (Thermo Fisher) y 1% de penicilina/estreptomicina (P/S, Thermo Fisher) como antibiótico. Las células se mantuvieron en condiciones constantes de temperatura (37°C) y concentración de CO₂ (5%). Para su manipulación se utilizó una campana de flujo laminar de bioseguridad nivel II-A (HERAEUS). Para recoger las células se utilizó tripsina-EDTA 0.05% (Thermo Fisher) tras lavarlas con tampón fosfato salino (PBS, Thermo Fisher), y se centrifugaron en una centrífuga de cabezal basculante Eppendorf 5810 R a una velocidad de 500 *g* durante 5 minutos y a temperatura ambiente.

2.1. Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) y su inmortalización

Los MEFs se obtuvieron a partir de embriones provenientes de cruces entre machos y hembras $Rnd3^{+/gt}$, tal y como se ha descrito anteriormente¹⁶¹. Las hembras gestantes se sacrificaron a los 13.5 días *post coitum*. Los embriones se manipularon bajo condiciones de esterilidad, procediendo a su separación individual. Seguidamente, se desecharon la cabeza y el hígado y se disociaron mecánicamente con la ayuda de un bisturí, añadiéndoles 1mL de tripsina durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se recogieron con 2mL de medio de cultivo, se trasladaron a tubos de centrifuga de 15mL con 10µL de DNasa (1U/µL Promega) y 7mL de medio de cultivo. Para finalizar se

pipeteó arriba y abajo con el fin de disgregar las células, se dejó decantar los restos de tejido por gravedad y el sobrenadante se traspasó a placas de 10cm.

Las células obtenidas se inmortalizaron mediante la transfección de un vector que expresa el antígeno *large T* del virus SV40 (ver apartado de plásmidos y transfecciones). Una vez transcurridas las 48 horas de transfección, la selección de los MEFs transformados se realizó por dilución, de modo que, al hacer los correspondientes pases se diluía el cultivo anterior (1:4 y 1:10) y se esperaba hasta que la placa alcanzase la confluencia, repitiendo este proceso durante 5 pases, obteniendo finalmente una línea estable.

2.2. Obtención de la línea 3T3 *RND3* KO

La línea celular 3T3 Rnd3 KO se obtuvo mediante la disrupción del gen *RND3* en células 3T3 de origen murino (3T3 WT), usando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9¹⁸⁷, en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Martín Molina (GENYO, Granada). El sistema de edición génica CRISPR/Cas9 utilizado se basó en el mecanismo de reparación NHEJ (*non-homologous end joining*).

El diseño de los ARN guías (ARNg) necesarios para dirigir a la endonucleasa Cas9 (derivada de *Streptococcus pyogenes*) al sitio de corte se llevó a cabo buscando, en la región deseada, la secuencia del motivo adyacente al protoespaciador 5'NGG. Posteriormente, la idoneidad de las secuencias candidatas se evaluó mediante BLAST, y se diseñaron dos ARNg (gRNA1fw y gRNA6rev), dirigidos frente a la región precedida por el codón de inicio, con el objetivo de interrumpir el marco de lectura de la proteína. Tras seleccionar ambos ARNg, se llevó a cabo una predicción *in silico* de su especificidad y eficiencia, empleando el programa CRISPOR (<http://crispor.tefor.net/>). Finalmente, la síntesis de ambos ARNg y su inserción en el plásmido pUC57, se realizó a través de la empresa GenScript (Piscataway, NJ, USA).

Cada uno de los plásmidos codificando los ARNg bajo el promotor U6 (pUC57_gRNA1fw y pUC57_gRNA6rev) se cotransfectaron en células 3T3 WT

junto con el plásmido CESC9, cedido por el grupo del Dr. Francisco Martín, que contiene un *cassete* de expresión de la endonucleasa Cas9, con un uso de codones optimizado, bajo el control del promotor del Citomegalovirus, y un *cassete* de expresión de la proteína verde fluorescente (eGFP) bajo el control del promotor del virus formador de focos en el bazo.

Después de 48 horas de la transfección, las células eGFP positivas fueron seleccionadas mediante citometría de flujo, y se mantuvieron en cultivo para posteriormente extraer ADN genómico y analizar los niveles de edición en el locus *RND3* mediante el ensayo de la T7 endonucleasa I (New England Biolabs). Una vez se confirmó la edición de *RND3* en la población eGFP positiva seleccionada, y mediante diluciones seriadas, se obtuvieron poblaciones celulares monoclonales (a partir de una única célula), con el fin de obtener una línea celular isogénica deficiente para Rnd3. La interrupción del marco de lectura de *RND3* en esa línea se constató mediante secuenciación (**Figura 12a**), y posteriormente se llevó a cabo la validación de la misma, analizando por western blot la expresión de la proteína Rnd3 (**Figura 12b**).

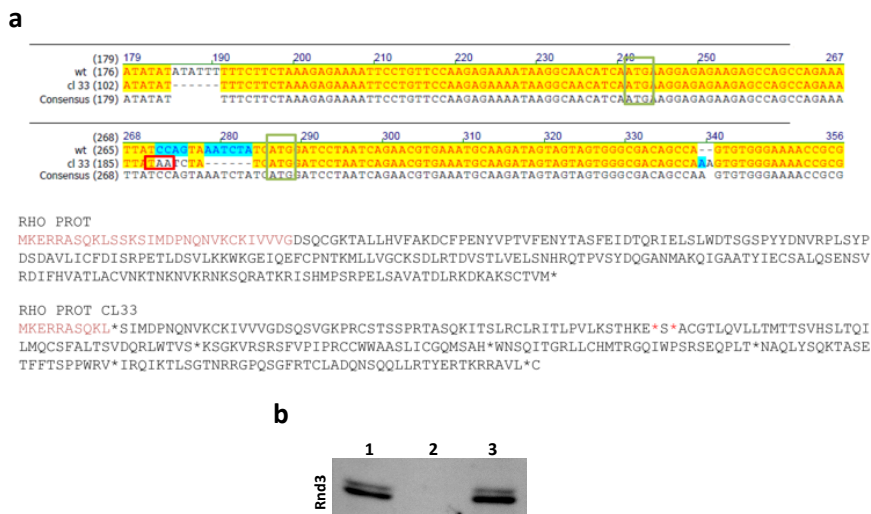


Figura 12. Obtención de la línea celular 3T3 Rnd3 KO. a) Análisis mediante alineación de secuencia de ADN del clon #33, en comparación con la secuencia consenso de la proteína Rnd3. b) Imagen representativa de la expresión de Rnd3 mediante western blot de algunos clones procedentes de la población positiva para eGFP. En la primera línea podemos observar el control positivo (células 3T3 WT), en la segunda línea, un clon (#33) deficiente para Rnd3 y en la tercera línea un clon positivo para Rnd3, indicando la no edición génica del mismo.

3. Plásmidos y transfecciones

En el presente trabajo utilizamos diferentes plásmidos, indicados en la **Tabla 1**. El procedimiento de obtención fue a través de su transformación en bacterias competentes *E. coli* DH5 α mediante el método de choque térmico. De este modo se obtuvieron colonias aisladas en placas de LB-agar (Miller) (Scharlau) en presencia de antibiótico (ampicilina, Sigma-Aldrich). Posteriormente, colonias aisladas fueron crecidas en medio LB (Lennox) (Laboratorios Conda) a 37°C y en agitación durante 16 horas. A continuación, realizamos la extracción del ADN plasmídico (GenElute Plasmid Miniprep kit, Sigma-Aldrich), y verificamos la presencia del plásmido mediante el uso de las correspondientes

enzimas de restricción, y su resolución en un gel de agarosa al 1% (VWR). Una vez comprobados, llevamos a cabo la producción a gran escala de los diferentes plásmidos mediante un kit de maxi-producción (PureLink Plasmid Filter midiprep Kit, Invitrogen), con el fin de poder realizar transfecciones en células eucariotas.

Las transfecciones se llevaron a cabo sembrando 250000 células en placas de 35mm (Sarstedt), de modo que obtuviéramos un 60% de confluencia. El día de la transfección resuspendimos el ADN en medio DMEM sin suero y se mezcló con lipofectamina 2000 (Thermo Fisher), también resuspendida en medio DMEM sin suero. Las células se cultivaron durante 6 horas con esta solución y se les cambió el medio por medio fresco. Transcurridas 48 horas de la transfección se realizaron los correspondientes análisis y se comprobó mediante western blot el nivel de expresión de la proteína de interés. En el caso de los plásmidos que presentaban el gen reportero GFP, las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia, permitiéndonos comprobar la eficiencia de la transfección.

Tabla 1. Lista de plásmidos empleados en las transfecciones de células eucariotas

Nombre	Abreviatura	Obtenido/cedido
pCMV5FlagGFPRnd3	FlagGFPRnd3	Laboratorio
mCherry-GFP-LC3	mCherry-GFP-LC3	Ana María Cuervo
U6mRnd3gRNA1fw	gRNA1fw	GenScript
U6mRnd3gRNA6rev	gRNA6rev	GenScript
CEWPEGFPCas9	CESC9	Francisco Martín
pBs-SV40	SV40	Ana María Cuervo

4. Inmunodetección de proteínas mediante western blot

Para realizar la extracción de proteínas se recogieron las células por centrifugación y se lavaron inmediatamente con PBS. Se volvieron a centrifugar

y resuspendimos el pellet celular en tampón de lisis RIPA (150mM NaCl, 1% NP40, 0.5% desoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50mM Tris-pH8), junto a un cóctel de inhibidores de proteasas (cComplete Tablets Mini EDTA-free, Roche) y de fosfatasas (10mM NaF, 1 μ M DTT y 1mM Na₃O₄V). Las muestras se incubaron durante 30 minutos en hielo y tras este tiempo se centrifugaron a 20.800 g durante 20 minutos, utilizando una centrífuga refrigerada (4°C) Eppendorf 5417 R con rotor de ángulo fijo, obteniendo así las proteínas en la fracción del sobrenadante.

En el caso de muestras de tejido de cerebro se llevó a cabo la lisis en una solución de sacarosa al 30% junto a los inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las muestras se sonicaron en frío (3 ciclos de 5 minutos al 35% de intensidad) y se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos, y se recogió el sobrenadante. Seguidamente se llevó a cabo la cuantificación de proteínas utilizando el método de Bradford y usando albúmina sérica bovina (BSA) para establecer una recta patrón y poder estimar por interpolación la concentración proteica de las muestras. La medida se llevó a cabo en un espectrofotómetro de placas (Victor X3, PerkinElmer) a una longitud de onda de 595nm.

La detección de proteínas se realizó mediante la técnica de western blot. Las muestras (40-70 μ g de proteína total) se resolvieron en geles de SDS-poliacrilamida (7.5%, 10%, 12.5% o 15%, dependiendo del tamaño de la proteína a detectar) en presencia de tampón de Laemmli (Bio-Rad) y hervidas durante 5 minutos. La separación por peso molecular de proteínas se llevó a cabo utilizando un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean III, Bio-Rad) a 200V durante 60 minutos en un tampón compuesto por 25mM Tris, 192mM Glicina y 0.1% SDS (TGS-10x, Bio-Rad) y utilizando el marcador Bench/Mark™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) para identificar el peso molecular de las proteínas.

A continuación, se realizó la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF 0.45 μ m (Immobilon TM-P Transfer Membrane, Millipore) durante 60 minutos a 100V y con un amperaje constante de 350mA. Para ello se utilizó el

sistema de transferencia MiniProtean (Bio-Rad) con un tampón compuesto por el 20% Metanol, 20mM Tris y 150mM Glicina (TG-10x Bio-Rad). Transcurrido este tiempo, las membranas se tiñeron con solución de rojo Ponceau S (Sigma-Aldrich) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia, seguido de lavados con agua bidestilada para eliminar los restos de la solución. Se incubaron en solución de bloqueo TBS-T (5% de leche descremada en polvo diluida en tampón tris salino (TBS) + 0.05% Tween-20, Sigma-Aldrich) durante 60 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Seguidamente se llevó a cabo la incubación en presencia del correspondiente anticuerpo primario diluido en 3% BSA (**Tabla 2**) durante 16 horas a 4°C y en agitación.

A continuación, se realizaron 3 lavados con TBS-T durante 5 minutos cada uno, para eliminar los restos del anticuerpo primario y, seguidamente, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario correspondiente (**Tabla 3**) diluido en solución de bloqueo. Esta incubación se realizó a temperatura ambiente durante una hora y transcurrido este tiempo, se volvieron a realizar 3 lavados, de 5 minutos cada uno, con TBS-T. Finalmente, la detección de las proteínas se realizó mediante quimioluminiscencia empleando el sistema ECL plus (Pierce ECL Plus Western Blotting Substrate, ThermoFisher) y el aparato ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science).

En el caso de querer reutilizar las membranas para su posterior incubación con otros anticuerpos, éstas se incubaron con una solución compuesta por 200mM glicina pH2.5, 1% SDS y 0.1M de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente, seguido de 3 lavados con TBS-T de 10 minutos cada uno y una posterior incubación con la solución de bloqueo durante una hora. En este momento, la membrana estaba preparada para volver a incubarla con otro anticuerpo primario.

La cuantificación de las bandas se realizó por densitometría de bandas utilizando el programa ImageJ y se normalizaron los valores obtenidos frente al control de carga, en nuestro caso, β -actina conjugada a peroxidasa.

Tabla 2. Lista de anticuerpos primarios empleados en el análisis de proteínas por western blot

Anticuerpos primarios	Casa comercial	Referencia	Dilución	Descripción
Anti-RhoE/Rnd3	Sigma-Aldrich	05-723	1:500	Monoclonal de ratón
Anti-Flag	Sigma-Aldrich	F-1804	1:500	Monoclonal de ratón
Anti-LC3B	Cell signaling	2775	1:500	Policlonal de conejo
Anti-Lamp-2 (gp96)	Invitrogen	51-2200	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-P62	Enzo	BML-PW9860	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-Atg5	Novus	NB110-53818	1:500	Policlonal de conejo
Anti-Hsp70/Hsc70 (13D3)	Novus	NB120-2788	1:1000	Monoclonal de ratón
Anti-phospho-P70 S6 kinasa	Cell signaling	9205	1:1000	Policlonal de conejo
Anti-P70 S6 kinasa	Cell signaling	9202	1:1000	Policlonal de conejo
Anti- β -actina-peroxidasa	Sigma-Aldrich	A3854	1:20000	Monoclonal de ratón

Tabla 3. Lista de anticuerpos secundarios empleados en el análisis de proteínas por western blot

Anticuerpos secundarios	Casa comercial	Referencia	Dilución
Anti-Mouse IgG-HRP (Fc)	Thermo Fisher	31437	1:5000
Anti-Rabbit IgG-HRP (Fc)	Thermo Fisher	31463	1:5000
Anti-Mouse IgM-HRP	Thermo Fisher	M31507	1:2000

5. Análisis de la proteólisis celular mediante ensayo de pulso y caza

Para realizar el ensayo de proteólisis, se cultivaron MEFs Rnd3^{+/+} y Rnd3^{gt/gt} inmortalizados en placas de 22mm, por triplicado, al 60-70% de confluencia celular (100000 células por placa). Se lavaron los pocillos con HBBS (*Hank's Balanced salt solution*, Thermo Fisher) y se añadió a cada pocillo 2μCi/ml de ³H-Leucina en medio DMEM con suero (700μL por pocillo, volumen final) durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se descartó el medio radiactivo, se lavaron las células con HBBS (4 veces) y se cultivaron en medio DMEM con 2.8mM de Leucina no marcada (700μL por pocillo, volumen final) en presencia o ausencia de suero y en presencia o ausencia de inhibidores selectivos de la degradación lisosomal (20mM NH₄Cl, Scharlab, y 0.2mM Leupeptina, Sigma-Aldrich), durante 0, 4, 12 y 24 horas.

A cada tiempo indicado se recogieron 70μL de medio por pocillo con la finalidad de medir la cantidad de aminoácido marcado radiactivamente libre en el medio. Previamente a la recogida del medio, y para evitar recoger células no adheridas, se centrifugaron las placas a 800 g durante 30 segundos. A continuación, cada muestra recogida se traspasó a una placa de 96 pocillos (6.5mm) con filtro de 0.45μm (Millipore Multiscreen Assay System, Millipore), conteniendo 100μL de ácido tricloroacético (TCA) al 20%. Seguidamente se añadieron 30μL de BSA (20mg/mL), y se incubaron las muestras a 4°C hasta la recogida del siguiente punto (para el último punto se realizó una incubación con BSA de una hora a 4°C).

Una vez recogidas todas las muestras, se realizó un filtrado por vacío en la placa de 96 pocillos y se recogieron 20μL del sobrenadante filtrado en una nueva placa de 96 pocillos, añadiendo 180μL de líquido de centelleo. Se cubrió la placa con plástico y se centrifugó a 500 g durante 1 minuto, para finalmente proceder a su lectura en un contador de centelleo Beta.

Por otro lado, una vez recogido el medio del último punto del ensayo (24 horas), se lavaron las células dos veces con HBBS y se llevó a cabo su lisis con 1.5mL de tampón de solubilización (0.1N NaOH, desoxicolato de sodio al 0.1%, Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37°C durante 1-2 horas. Se mezcló bien y se cogieron 20µL de la muestra. Este volumen se transfirió a una placa de 96 pocillos, donde añadimos 180µl de líquido de centelleo y se realizó la lectura de la placa, como se ha descrito anteriormente.

Para el cálculo de la tasa de degradación proteica, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Proteólisis} = (\text{Valor radioactividad}_{\text{fracción soluble}} / \text{Valor radioactividad}_{\text{total}}) \times 100$$

Siendo la fracción soluble el valor medio de radioactividad correspondiente a los pocillos que contenían el sobrenadante celular a cada tiempo indicado, y la fracción radioactiva total la correspondiente a la suma de la radioactividad de los pocillos que contenían el sobrenadante celular más el correspondiente a la radioactividad de la fracción del lisado celular, a cada tiempo indicado.

6. Analisis del flujo autofágico a través del marcador LC3

Se entiende por flujo autofágico la combinación de dos etapas del proceso: i) la formación del autofagosoma, y ii) su posterior fusión con el lisosoma, para su reciclaje^{188, 189}. Con el fin de estudiar el flujo autofágico se analizó, mediante western blot, el principal marcador de autofagia, LC3. Esta proteína presenta dos formas: una citosólica (LC3-I) y otra que se encuentra lipidada y asociada a la membrana del autofagosoma/autofagolisosoma (LC3-II). El análisis de estas dos formas de LC3 mediante western blot es posible gracias a que la forma lipidada (LC3-II) presenta una migración diferente a la forma citosólica

(LC3-I) y su relación (LC3-II/LC3-I) se considera un buen marcador para el estudio de autofagia.

Fibroblastos procedentes de embriones de ratones $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$ (MEFs) inmortalizados, así como las líneas celulares de fibroblastos inmortalizados 3T3 WT y 3T3 $Rnd3$ KO, se cultivaron a una densidad de 400000 células en placas de 35mm en presencia o ausencia de suero. Además, se trataron con inhibidores de la degradación lisosomal (20mM NH_4Cl y 0.2mM Leupeptina) durante 0, 2 y 4 horas. Una vez finalizado el experimento se recogieron las muestras y se procesaron para el análisis de los niveles de LC3-II y LC3-I, mediante western blot.

Con los datos obtenidos pudimos calcular la formación de autofagosomas (AFG), la velocidad de fusión (flujo de LC3) y el flujo neto de LC3, mediante los cálculos representados en la **Figura 13**.

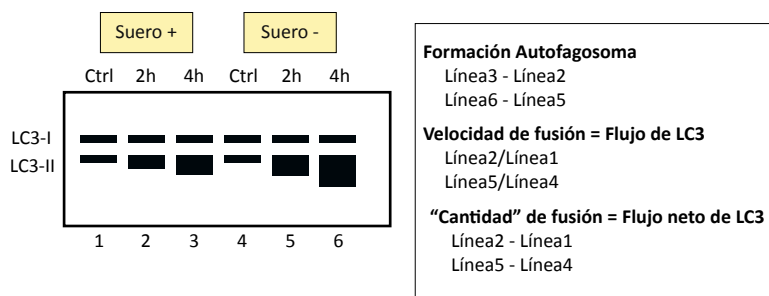


Figura 13. Esquema representativo del análisis por western blot y posterior cálculo del flujo autofágico.

Otro método utilizado para analizar el flujo autofágico fue mediante la transfección de los MEFs inmortalizados $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$ con el plásmido mCherry-GFP-LC3, cedido por la Dra. Ana María Cuervo. Mediante el uso de esta construcción, se analizó la dinámica *in vivo* de formación del AFG y su posterior fusión con el lisosoma: la molécula GFP se degrada a pH ácido, de modo que cuando se forma el autofagolisosoma (AFGL), se observa una desaparición de su señal fluorescente. Sin embargo, la fluorescencia emitida

por la proteína mCherry es estable independientemente del pH. Así, un incremento en el número de puntos amarillos (GFP-positivos/mCherry-positivos) indica la formación de AFG, mientras que la observación de puntos rojos (GFP-negativos/mCherry-positivos) indica la etapa posterior de fusión con el lisosoma (**Figura 14**).

Para la realización de estos experimentos, se cultivaron MEFs Rnd3^{+/+} y MEFs Rnd3^{gt/gt} immortalizados y se transfectaron con este plásmido, tal y como se describe en el apartado 3. Transcurridas 48 horas de la transfección, las células se cultivaron en presencia o ausencia de suero durante 4 horas y se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4% para su posterior análisis por fluorescencia (Operetta High-Content Imaging system, Thermo Fisher). Con los datos obtenidos pudimos cuantificar el contenido de vesículas autofágicas (AV, puntos mCherry-positivos), el número de AFG (puntos GFP-positivos y mCherry-positivos) y el número de AFGL (puntos mcherry-positivos menos puntos GFP-positivos).

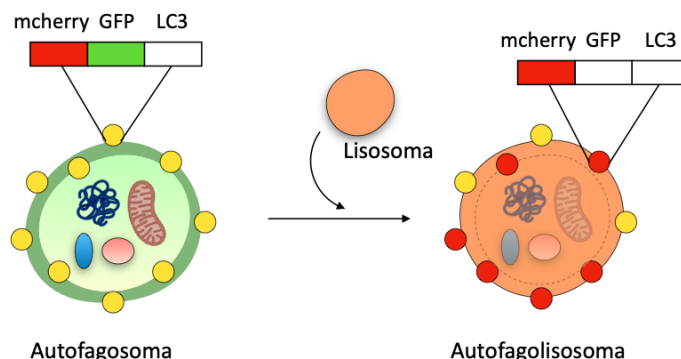


Figura 14. Esquema representativo del estudio del flujo autofágico mediante la transfección con el vector mCherry-GFP-LC3. A la izquierda se observan puntos amarillos en la membrana del AFG, resultantes de la combinación de la fluorescencia de las dos moléculas (roja y verde). Sin embargo, a la derecha, donde se encuentra el AFG ya fusionado con el lisosoma (AFGL), se observan únicamente puntos rojos, debido a que la molécula GFP se degrada a pH ácido y por tanto solo podemos ver la fluorescencia roja de la molécula mCherry.

7. Experimentos de inhibición de Ulk1/2

Células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron cultivadas en placas de 35mm al 80% de confluencia (400000 células) y se cultivaron en presencia o ausencia de suero y en presencia o ausencia del inhibidor de Ulk1/2, MRT68921 diclorhidrato (MRT68, Sigma-Aldrich), durante 6 horas. Además, durante las dos últimas horas del experimento, las células fueron tratadas con 20nM de Bafilomicina A1 (BafA1, Sigma-Aldrich) como inhibidor de la degradación lisosomal. Finalizado el tratamiento, se recogieron las células y se procesaron para la detección de los niveles de LC3-II y LC3-I mediante la técnica de western blot.

8. Experimentos de inhibición de ROCK-I

Para los estudios de inhibición de la proteína kinasa ROCK-I se cultivaron células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO al 70-80% de confluencia (placas de 35mm, 400000 células) y al día siguiente se trataron con 10 μ M del inhibidor de ROCK-I Y-2763 (StemCell) durante 4 horas. Con el fin de estudiar el efecto de la inhibición de ROCK-I sobre autofagia, las células fueron cultivadas en presencia de suero así como en presencia o ausencia de NH₄Cl/Leupeptina. A continuación, se recogieron las células y se procesaron para la detección de los niveles de LC3-II y LC3-I mediante la técnica de western blot.

9. Aislamiento de lisosomas

El aislamiento de lisosomas se llevó a cabo en el laboratorio de la Dra. Ana María Cuervo (Albert Einstein College of Medicine, NY). Durante todo el proceso se mantuvieron las muestras en frío (incluyendo los pasos de centrifugación) y se evitó la entrada de agua en las muestras.

Se utilizaron ratas previamente ayunadas durante 16-20 horas y transcurrido este tiempo se sacrificaron para obtener el hígado. Una vez obtenido el hígado, se lavó varias veces con una solución de 0.25M de sacarosa fría para eliminar toda la sangre y se transfirió a un tubo limpio donde se procedió a su troceado, manteniéndolo en hielo para evitar la actividad de las proteasas. Se añadieron 3 volúmenes de solución 0.25M de sacarosa fría por gramo de hígado y se procedió a una homogeneización suave a 4°C. Seguidamente se filtró el homogenado a través de una malla y se añadió solución 0.25M de sacarosa fría hasta un volumen final de 40mL. En este punto separamos una pequeña muestra del homogenado (200µL) en un tubo Eppendorf y lo mantuvimos en hielo con inhibidores de proteasas. El resto de la muestra se traspasó a un tubo y se centrifugó a 6800 *g* durante 5 minutos (Beckman Allegra 64R, rotor F0630) y se recogió el sobrenadante por decantación en un nuevo tubo. Seguidamente se centrifugó a 17000 *g* durante 10 minutos a 4°C (Beckman Allegra 64R, rotor F0630) y separamos el sobrenadante por un lado (para posterior obtención de la fracción citosólica y RE) y el *pellet* para la obtención de la fracción lisosomal.

Respecto al sobrenadante, se utilizó un volumen de 2mL al que se le añadieron inhibidores de proteasas, y se traspasó a un tubo para su centrifugación durante una hora a 100000 *g*, usando un rotor de ángulo fijo TLA110 (Beckman). Tras la centrifugación se separó el sobrenadante (fracción citosólica) y el *pellet*, el cual fue resuspendido en 0.5mL de 0.25M de sacarosa fría (fracción RE). Se guardaron ambas fracciones a 4°C hasta el final del proceso.

Respecto al *pellet*, se procedió a su resuspensión con la ayuda de un tubo de vidrio frío. Una vez separado del fondo del tubo, se añadieron 35mL de solución 0.25M de sacarosa fría y se centrifugó la muestra a 17000 *g* durante 10 minutos (Beckman Allegra 64R, rotor F0630). Descartamos el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió con la ayuda de un tubo de vidrio frío, añadiendo 700 μ L de solución 0.25M de sacarosa fría (o hasta un volumen final de 1.1mL) y 2 volúmenes (2.2mL) de Metrizamida 85.6% (Merck), mezclando suavemente con la ayuda de una pipeta serológica.

A continuación, transferimos la muestra a un tubo de ultracentrífuga y añadimos un gradiente de Metrizamida (2mL de 32.8%, 3.3mL de 26.3% y 3.5mL de 19.8%, respectivamente). En cada paso de adición de las diferentes soluciones de Metrizamida se procedió a añadir suavemente el volumen indicado, evitando la mezcla con la anterior solución y evitando tocar las paredes. Finalmente, se añadió solución sacarosa 0.25M hasta rellenar el tubo y ultracentrifugamos a 141000 *g* durante 69 minutos (aceleración 4 y deceleración 9, rotor de cabezal basculante SW 41 Ti. Beckman). Después de la centrifugación se retiró cuidadosamente el tubo para evitar mezclar las interfases y recogimos la interfaz 1 y 2 de la parte superior del tubo, pasándola a un tubo limpio y añadimos 5-10 volúmenes de 0.25M de sacarosa fría. El último paso consistió en una centrifugación a 37000 *g* durante 15 minutos. Finalmente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 0.5mL de 0.25M de sacarosa fría más inhibidores de proteasas, obteniendo la fracción lisosomal.

El resumen de todo el proceso se representa en la **Figura 15**.

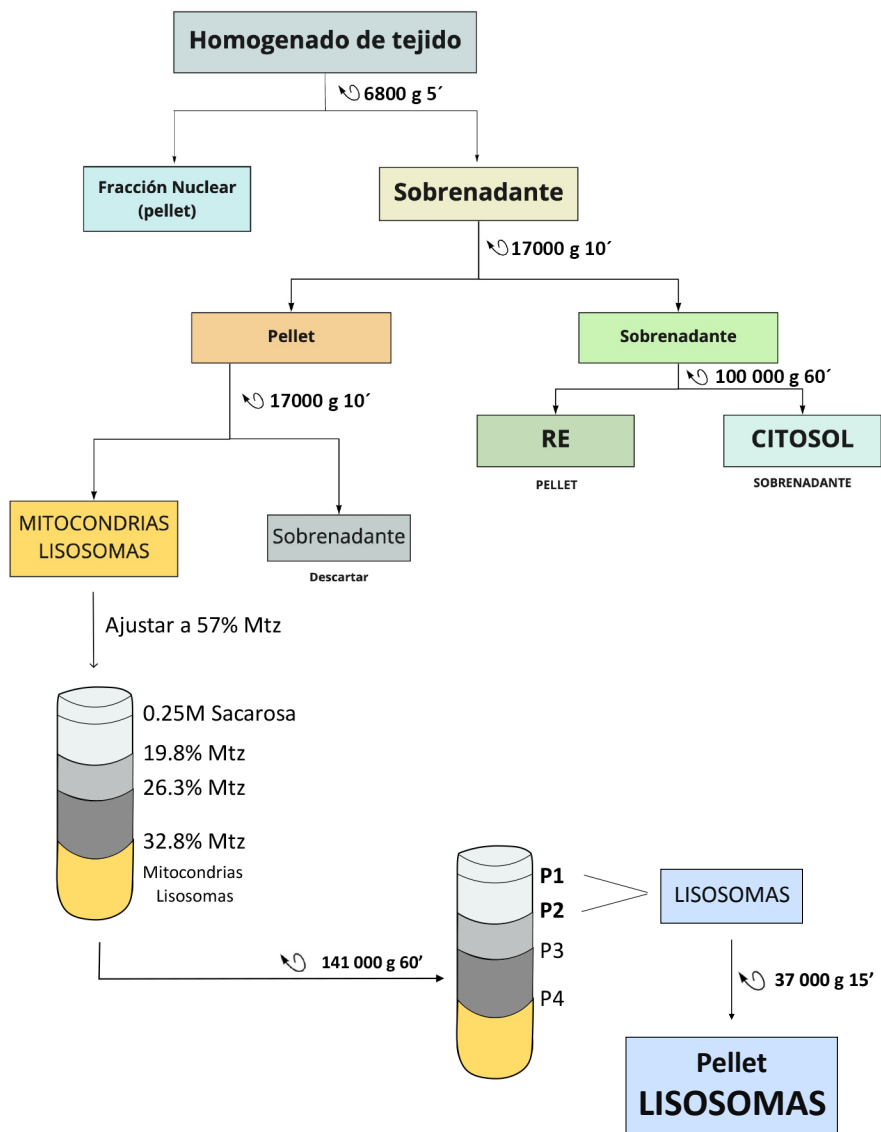


Figura 15. Esquema representativo del proceso de obtención de las fracciones que contienen citosol, retículo endoplásmico y lisosomas a través de ultracentrifugación en gradiente de Metrizamida.

10. Estudio de la degradación proteica de Rnd3

Para el estudio de la degradación de Rnd3, las células 3T3 WT se cultivaron al 70-80% de confluencia (400000 células en placas de 35mm) y se trataron con inhibidores selectivos del proteasoma (10 μ M Lactacistina, Sigma-Aldrich) o con inhibidores selectivos del lisosoma (0.2mM Leupeptina + 20mM de NH₄Cl), respectivamente, durante 6 y 16 horas en presencia o ausencia de suero. A continuación, se recogieron las células, se lisaron y se cuantificaron para posteriormente detectar los niveles de Rnd3 mediante western blot.

11. Ensayos de viabilidad celular

Para los ensayos de viabilidad celular, las células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO se cultivaron en placas de 22mm al 70-80% de confluencia (150000 células por placa) en medio DMEM en ausencia o presencia de 2-desoxi-D-Glucosa (2-DG, 10mM) (4, 6 y 16 horas). Tras el tratamiento, se lavaron los pocillos con PBS, se tripsinizaron las células y se recogieron en tubos Eppendorf para realizar el conteo. Para ello, se utilizó la cámara de Neubauer y el azul de tripano, que tiñe células muertas, y se realizaron los cálculos de células vivas para cada pocillo, obteniendo la media de los triplicados.

12. Citometría de flujo

Para caracterizar la cantidad de mitocondrias y su estado funcional utilizamos el marcador mitocondrial MitoTracker Green FM (ThermoFisher Scientific) y TMRM (Tetramethylrhodamine, methyl ester, ThermoFisher Scientific). TMRM es un indicador del potencial de membrana de la mitocondria, tiñendo por tanto las mitocondrias activas/funcionales, mientras que MitoTracker Green se localiza en todas las mitocondrias, independiente del potencial de membrana, permitiendo por tanto saber la cantidad de mitocondrias totales que hay.

Las células se sembraron a una densidad de 400000 células en placas de 35mm. Tras 24 horas se lavaron con PBS y se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo con los diferentes marcadores (200nM de TMRM y 200nM de MitoTracker Green) durante 30 minutos a 37°C y al 5% de CO₂. Además, se añadieron controles negativos (sin tinción). Las células fueron incubadas al mismo tiempo que con el marcador mitocondrial con 10µM de FCCP durante 15 y 30 minutos.

Transcurridos los diferentes tiempos de tratamiento, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se recogieron para posteriormente analizarlas por citometría de flujo, utilizando para ello el citómetro CitoFlex (Beckman Coulter).

13. Análisis metabólico

Para el estudio del metabolismo celular, se utilizó un analizador Seahorse XF24 (Agilent), que permite la determinación de la capacidad de respiración de las células y su dependencia al metabolismo glucolítico mediante el uso secuencial de inhibidores metabólicos.

El día anterior al ensayo se preparó la placa de calibración (Seahorse XFe24, Agilent) añadiendo 1mL de la solución calibrante (XF Calibrant pH7.4, Agilent) a cada pocillo para hidratar los sensores y se incubó a 37°C durante 16 horas. En paralelo, se cultivaron 90000 células por pocillo, y por triplicado para cada condición, en placas Seahorse XF24 (Agilent) de 24 pocillos conteniendo medio de cultivo DMEM durante 16 horas. A continuación, las células se equilibraron con medio de ensayo Seahorse (XF Base Medium Minimal DMEM, Agilent) suplementado tal y como se describe abajo, dependiendo de si el ensayo era para medir la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial (OCR) o la tasa de acidificación extracelular (ECAR). Para ello, se realizaron 3 lavados con el medio Seahorse suplementado en cada uno de los pocillos, eliminando los restos del medio DMEM de cultivo, y se mantuvieron en un volumen final de 180µL, a 37°C de incubación, sin CO₂ y durante 60 minutos, inmediatamente antes del ensayo.

13.1. Análisis de la tasa de consumo de oxígeno mitocondrial

El análisis de OCR se llevó a cabo mediante la incubación de las células en medio Seahorse suplementado con 1µM de glucosa, 2mM de L-glutamina (Lonza) y 1mM de piruvato de sodio (Lonza) en ausencia de CO₂. Durante el tiempo de incubación (60 minutos), preparamos las inyecciones del equipo para calibrarlo, añadiendo en las posiciones A, B, y C: 1µM de oligomicina (Sigma-Aldrich), 5µM de FCCP (Sigma-Aldrich) y 1µM de rotenona (Sigma-Aldrich), respectivamente. Oligomicina es un inhibidor del complejo V (ATP sintasa) de la cadena respiratoria, lo que nos permite diferenciar el porcentaje de oxígeno consumido durante la síntesis de ATP. Se utilizó FCCP (desacoplante mitocondrial), para calcular la capacidad máxima respiratoria de las células y Rotenona, para inhibir el complejo I de la cadena respiratoria. De este modo, se pudo medir el cambio en la concentración de oxígeno disuelto en el medio, obteniendo la tasa de consumo de O₂ expresado en picomoles por minuto (pmol/min) (**Figura 16**), y calcular la respiración basal

($OCR - OCR_{ROT}$), capacidad máxima de respiración ($OCR_{FCCP} - OCR_{ROT}$), el consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP ($OCR - OCR_{OLIG}$), y respiración no mitocondrial (OCR_{ROT}).

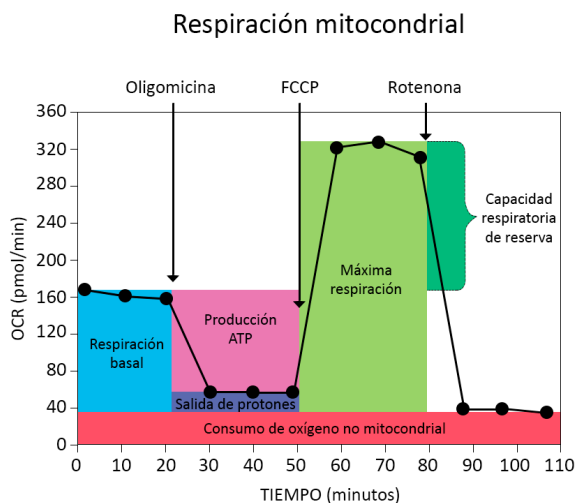


Figura 16. Esquema representativo del análisis de la tasa de consumo de oxígeno

13.2. Análisis de la tasa de la acidificación extracelular

El análisis de la acidificación extracelular (ECAR) se llevó a cabo utilizando el medio Seahorse suplementado con 2mM de L-glutamina (Lonza) y piruvato de sodio (Lonza). Al igual que en el caso anterior, durante el tiempo de incubación de las células sin CO_2 preparamos las inyecciones del equipo, añadiendo en las posiciones A, B y C: 30mM de glucosa, 1 μ M de oligomicina y 0.1M de 2-DesoxiGlucosa (2-DG, Fluka), respectivamente. De este modo, el protocolo establecido nos permitió medir la acidificación del pH en el medio debido a la liberación de protones en el medio extracelular (**Figura 17**). Primero de todo, las células fueron incubadas en ausencia de glucosa para generar un estrés glucolítico. A continuación, se introdujo una concentración saturante de glucosa que nos permitió obtener la tasa de glucólisis en condiciones basales. La adición de oligomicina nos permitió analizar la

energía obtenida a través de la ruta glucolítica y revela por tanto la máxima capacidad glucolítica de la célula. Por último, la adición de 2-DG, un inhibidor de la ruta glucolítica, nos permitió analizar la dependencia de la misma.

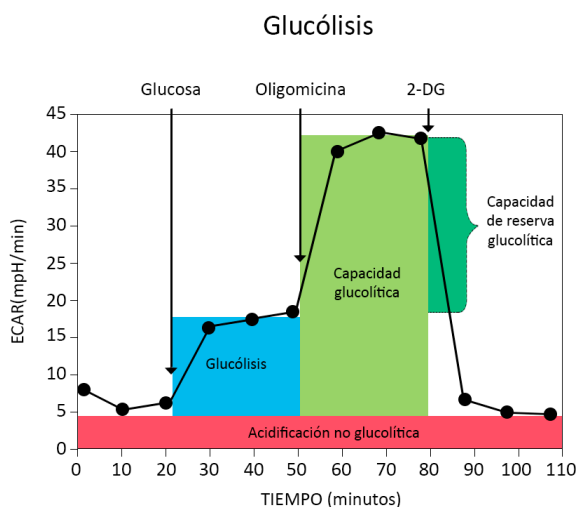
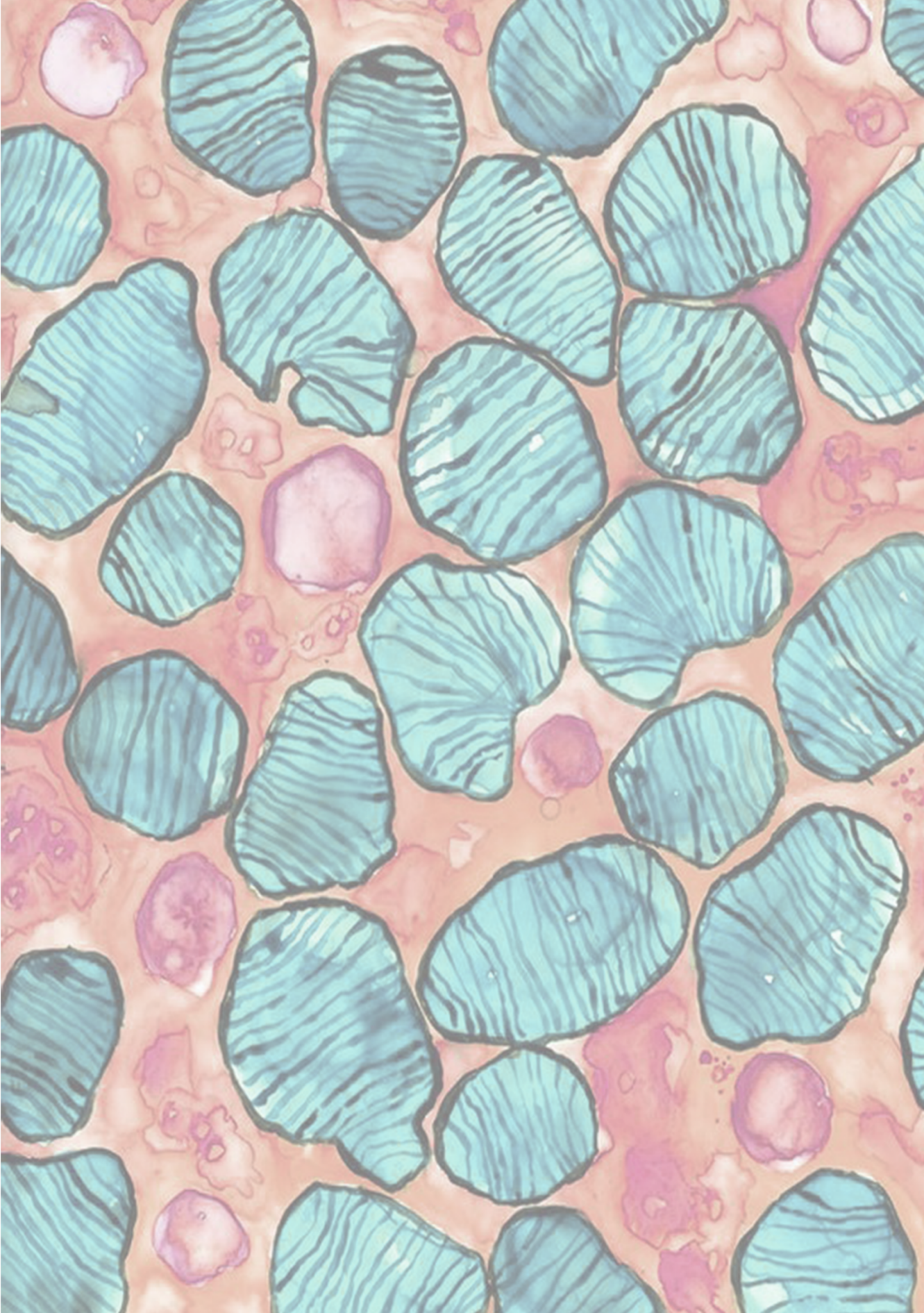
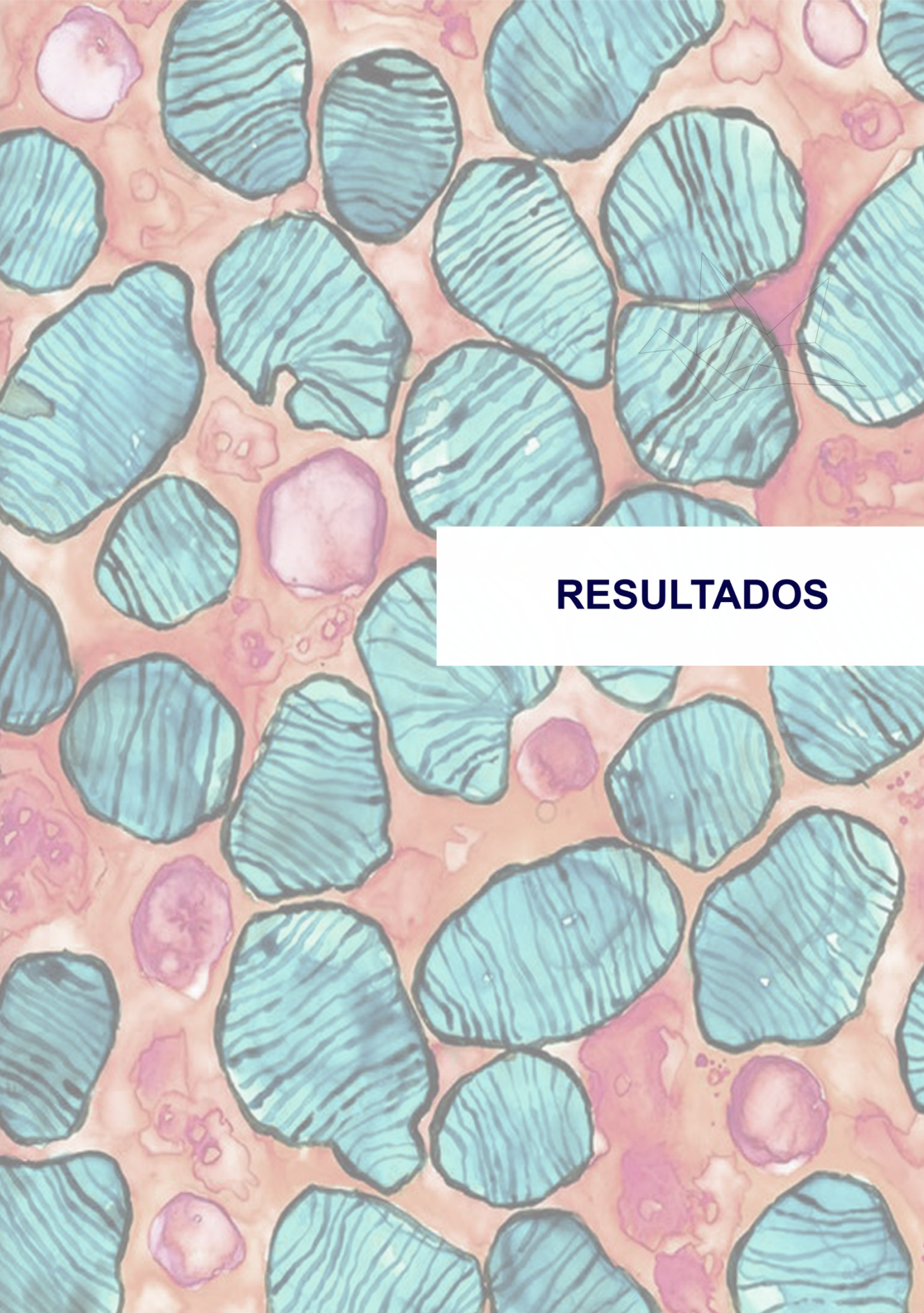


Figura 17. Esquema representativo del análisis de la tasa de acidificación extracelular del medio.

14. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el software estadístico Prism (GraphPad). Los datos se expresaron como la media \pm SEM (error estándar). Para analizar las diferencias estadísticas entre grupos se utilizó un ANOVA de dos vías. En caso de existir diferencias individuales, éstas se analizaron utilizando un test *post hoc* de Tukey. Para comparar la media entre grupos se usó la prueba *t* de Student. En todos los casos, las diferencias se consideraron significativas cuando el valor *p* fue menor de 0.05 (**p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 y *****p*<0.0001).





RESULTADOS

1. La ausencia de Rnd3 produce un aumento en la degradación de proteínas

En primer lugar, y puesto que resultados previos en nuestro laboratorio mostraban una serie de alteraciones morfológicas en cortes histológicos de cerebro procedentes del ratón deficiente en Rnd3 ($Rnd3^{gt/gt}$) compatibles con alteraciones en el proceso de autofagia, decidimos analizar, mediante western blot, los niveles basales de la relación LC3-II/LC3-I en muestras de cerebro de ratones $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$ de 15 días de edad (P15). Los resultados obtenidos mostraron una disminución significativa de LC3-II/LC3-I en ausencia de Rnd3 en comparación con los cerebros $Rnd3^{+/+}$ (**Figura 18**).

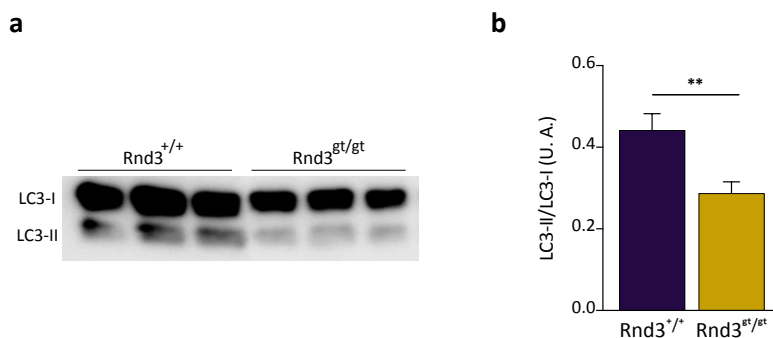


Figura 18. La relación LC3-II/LC3-I disminuye en muestras de cerebro de ratones $Rnd3^{gt/gt}$. a) Imagen representativa del marcador LC3 (LC3-I, banda superior y LC3-II, banda inferior) analizado por western blot, en muestras de cerebro de ratón $Rnd3^{+/+}$ y $Rnd3^{gt/gt}$. b) Cuantificación de la relación LC3-II/LC3-I. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de Student (n=3).

Tal y como se ha descrito previamente, este modelo murino deficiente para Rnd3 muestra una muerte postnatal temprana, alcanzando rara vez las tres semanas de vida. Además, la ausencia de Rnd3 produce una alta mortalidad prenatal, por lo que su obtención resulta costosa. Por ello,

decidimos utilizar como modelo para el estudio de la implicación de Rnd3 en autofagia fibroblastos embrionarios (MEFs) inmortalizados, obtenidos a partir de ratones Rnd3^{+/+} y Rnd3^{gt/gt} (ver Material y Métodos). Una vez obtuvimos las células, y en colaboración con el grupo de la Dra. Ana María Cuervo (Albert Einstein College of Medicine, New York), analizamos su tasa de degradación de proteínas intracelulares. Para ello, cultivamos las células en presencia o ausencia de suero, como principal modelo de inducción de autofagia, y en presencia o ausencia de NH₄Cl/Leupeptina, como inhibidores selectivos de la degradación lisosomal, y se llevó a cabo el marcaje de las proteínas con ³H-Leucina, tal y como se describe en Material y Métodos. Los resultados representados en la **Figura 19** muestran cómo las células deficientes en Rnd3, no tratadas con NH₄Cl/Leupeptina, presentaban una mayor tasa de degradación proteica (58% frente al 44.4% en células Rnd3^{+/+} en presencia de suero y 64.8% frente al 49.6% observado en células Rnd3^{+/+} en ausencia de suero). Además, la utilización de NH₄Cl/Leupeptina produjo una disminución de la tasa de degradación proteica en ambos genotipos, alcanzando los mismos niveles de degradación y sugiriendo, por tanto, que las diferencias encontradas en las células Rnd3^{gt/gt} eran, en parte, dependientes de la vía lisosomal.

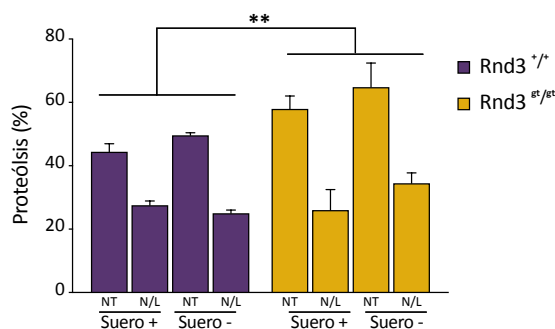


Figura 19. MEFs Rnd3^{gt/gt} presentan una mayor tasa de proteólisis. Análisis de la tasa de degradación proteica en MEFs Rnd3^{+/+} y Rnd3^{gt/gt} mediante el marcaje con ³H-Leucina. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero y en presencia (N/L) o ausencia (NT) de NH₄Cl/leupeptina. El ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos (n=3).

2. La ausencia de Rnd3 produce un aumento en autofagia

Con el objetivo de estudiar si Rnd3 estaba implicada de manera específica en alguna de las dos etapas del flujo autofágico (formación del autofagosoma, AFG y su posterior maduración y fusión con el lisosoma), analizamos, mediante western blot, los cambios producidos en la relación LC3-II/LC3-I como consecuencia de la inhibición de la degradación lisosomal. De modo que, tras el tratamiento con NH₄Cl/Leupeptina, como método de bloqueo de la degradación de la vía autofágica, un aumento en la relación LC3-II/LC3-I entre 2 y 4 horas de tratamiento, solo puede ser debido a la síntesis *de novo* de AFG. Por otro lado, el incremento en la relación LC3-II/LC3-I durante el tratamiento con NH₄Cl/Leupeptina, comparado con la ausencia de inhibidor (0 horas), representa la velocidad de fusión de los autofagolisosomas (AFGL), pudiendo analizar, por tanto, el flujo de LC3 (LC3-II/LC3-I a 2 horas de tratamiento vs LC3-II/LC3-I a 0 horas de tratamiento). Asimismo, podemos obtener el flujo neto de LC3 (número de

AFGL degradados), que se obtiene como resultado de la diferencia entre la relación LC3-II/LC3-I de células tratadas con NH_4Cl /Leupeptina a 2 y 0 horas.

Para realizar este estudio, los MEFs $\text{Rnd3}^{+/+}$ y $\text{Rnd3}^{\text{gt/gt}}$ fueron cultivados en presencia o ausencia de suero (4 horas) y en presencia o ausencia de NH_4Cl /leupeptina (0, 2 y 4 horas respectivamente). A continuación, se llevó a cabo la obtención de las muestras y el análisis de la relación LC3-II/LC3-I por western blot (**Figura 20a**), tal y como se ha descrito en Material y Métodos. Los resultados de estos experimentos no mostraron diferencias significativas en el contenido de vesículas autofágicas (AV) en ausencia de Rnd3 , respecto a células $\text{Rnd3}^{+/+}$ (**Figura 20b**). Del mismo modo, no se observaron diferencias significativas entre genotipos en el flujo de LC3 así como en el flujo neto de LC3 (**Figura 20d, e**). Sin embargo, si que hubo diferencias significativas en la formación de AFG, que se encontraba aumentada en MEFs $\text{Rnd3}^{\text{gt/gt}}$ respecto a MEFs $\text{Rnd3}^{+/+}$ (**Figura 20c**).

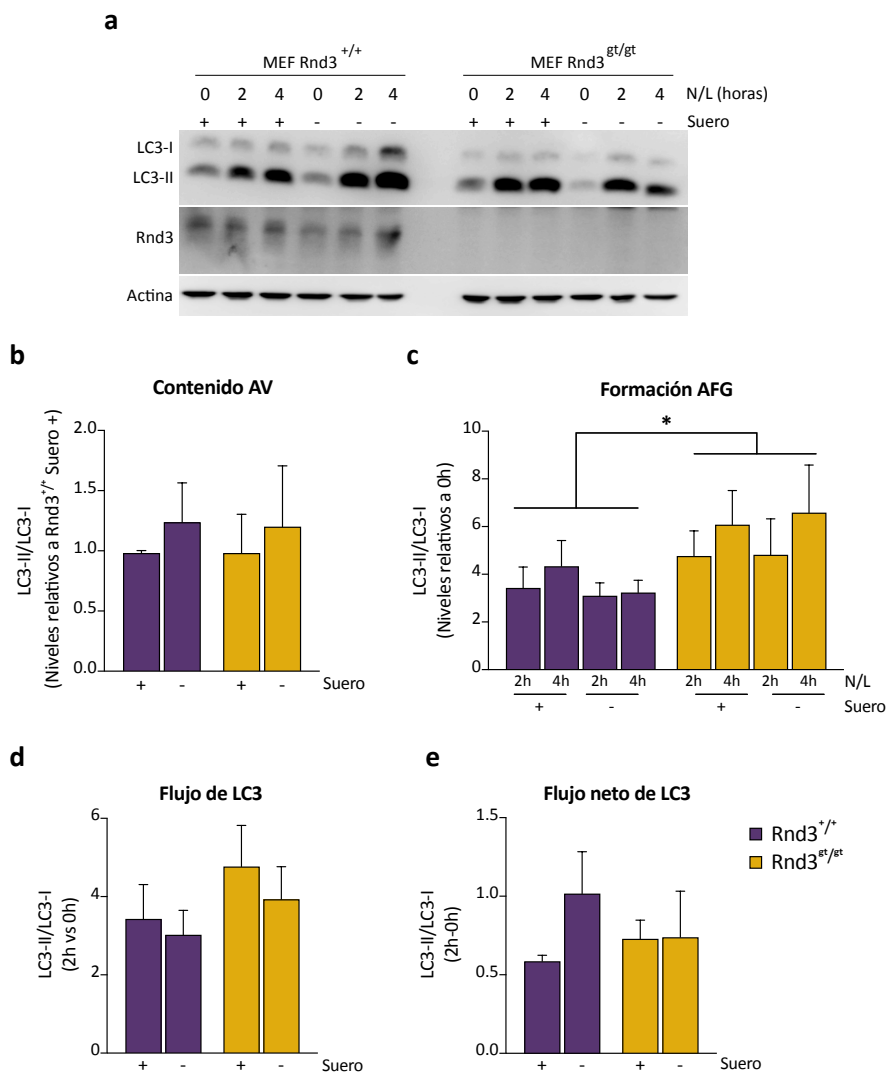


Figura 20. La ausencia de Rnd3 produce un aumento de la formación de los autofagosomas. **a)** Imagen representativa de los niveles de LC3-I y LC3-II analizados por western blot en MEFs Rnd3^{+/+} y Rnd3^{gt/gt}. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero y en presencia o ausencia de NH₄Cl/leupeptina (N/L). Las gráficas representan la cuantificación por densitometría de la relación LC3-II/LC3-I. Con los datos resultantes se calculó el contenido total de vesículas autofágicas (AV) (**b**), la formación de autofagosomas (AFG) (**c**), el flujo de LC3 (**d**) y el flujo neto de LC3 (**e**), tal y como se detalla en Material y Métodos. El ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos en la formación de AFG (n=5).

Los resultados anteriormente descritos mostraron que las células $Rnd3^{gt/gt}$ presentaban un aumento significativo de la formación de AFG. Sin embargo, para confirmar en qué etapa del proceso de autofagia estaba implicado $Rnd3$, utilizamos la construcción mCherry-GFP-LC3 que nos permitió monitorizar *in vivo* la dinámica de formación del AFG, y su posterior fusión con el lisosoma (ver Material y Métodos). La señal de la proteína verde fluorescente (GFP) es muy sensible a pH ácido y/o a las condiciones proteolíticas del lumen del lisosoma, mientras que la fluorescencia roja de la proteína mCherry es más estable. Por ello, la colocalización de las dos fluorescencias (mCherry y GFP, puntos amarillos) indica vesículas que no se han fusionado con el lisosoma (AFG). Por el contrario, la señal de mCherry (puntos rojos) en ausencia de GFP, se corresponde con AFGL.

Para llevar a cabo este estudio, se transfectaron MEFs $Rnd3^{+/+}$ y MEFs $Rnd3^{gt/gt}$ con la construcción mCherry-GFP-LC3 y, al cabo de 48 horas, se cultivaron en presencia o ausencia de suero durante 4 horas. A continuación, se analizó por microscopía de fluorescencia el número de puntos positivos para mCherry y GFP (amarillo), así como el número de puntos positivos para mCherry (rojo), tal y como se detalla en Material y Métodos. Los datos obtenidos mostraron que las células deficientes en $Rnd3$ presentaban la mitad del contenido de AV respecto a MEFs $Rnd3^{+/+}$, tanto en presencia como en ausencia de suero (**Figura 21a**). Además, al analizar el flujo de vesículas, observamos que las células $Rnd3^{gt/gt}$ presentaban 5 veces la cantidad de AFG en presencia de suero y 7 veces en ausencia de suero, respecto a MEFs $Rnd3^{+/+}$ (**Figura 21b**). Por otro lado, cuando analizamos el número total de AFGL, observamos que las células deficientes para $Rnd3$ tenían la mitad de AFGL comparado con lo observado en células $Rnd3^{+/+}$ (**Figura 21c**).

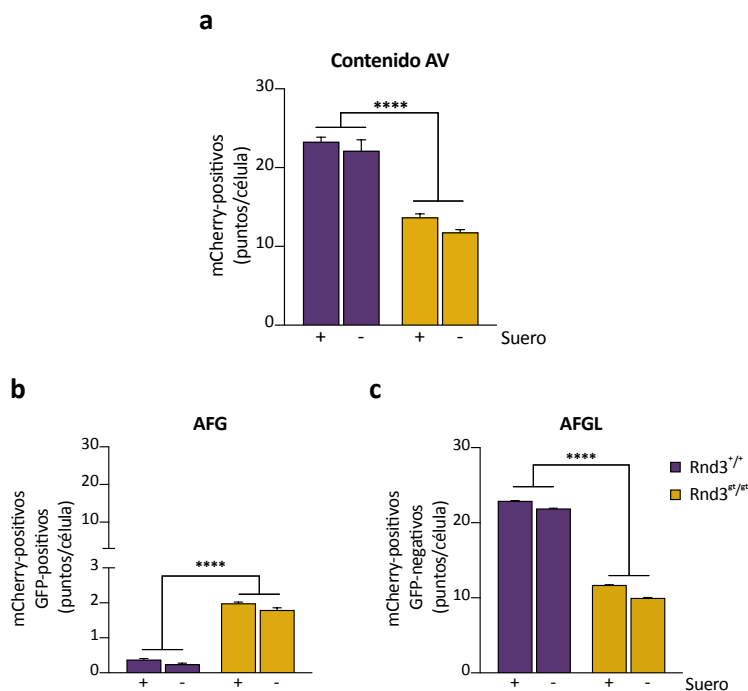


Figura 21. MEFs deficientes en la expresión de Rnd3 presentan un mayor flujo autofágico. MEFs Rnd3^{+/+} y Rnd3^{gt/gt} transfectados con el vector mCherry-GFP-LC3 se cultivaron en presencia o ausencia de suero durante 4 horas. Posteriormente se analizó mediante microscopía de fluorescencia el número de puntos por célula positivos para mCherry (rojo) y GFP (verde). Como resultado de este análisis se obtuvo: (a) el contenido total de AV (mCherry-positivos, puntos rojos más puntos amarillos); (b) el número de AFG (mCherry-positivos y GFP-positivos, puntos amarillos) y, (c) el número de AFGL (mCherry-positivos y GFP-negativos, puntos rojos menos puntos amarillos). El ANOVA mostró diferencias entre genotipos para cada gráfica (n=6). Las diferencias individuales se analizaron utilizando el test de Tukey, siendo significativas entre genotipos tanto en presencia como en ausencia de suero para cada gráfica (****p<0.0001).

En resumen, estos estudios, junto con el análisis de la relación de los niveles LC3-II/LC3-I por western blot, sugieren que la ausencia de Rnd3 produce un mayor flujo autofágico, resultando en una rápida degradación de los AFGL. Además, el aumento de la formación de AFG observado en MEFs Rnd3^{gt/gt} podría ser consecuencia de esta mayor velocidad de degradación.

Tras analizar el efecto de la ausencia de Rnd3 sobre autofagia en MEFs, quisimos comprobar si el efecto sobre autofagia observado en estas células se reproducía en la línea celular NIH3T3 (a partir de ahora referida como 3T3 WT). Para ello y en colaboración con el grupo del Dr. Francisco Martín (Genyo) se llevó a cabo la obtención de una línea celular estable donde se disrupcionó el gen *RND3* (3T3 Rnd3 KO) usando el sistema de edición génica CRISPR/Cas9, tal y como se describe en Material y Métodos.

Una vez obtenida la línea celular 3T3 Rnd3 KO se procedió a realizar una comparativa del estudio del flujo autofágico. Los resultados obtenidos en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO analizados por western blot (**Figura 22a**) indicaron que, al igual que ocurría con MEFs, no existían diferencias significativas en el contenido de AV en ausencia de Rnd3 respecto a células 3T3 WT (**Figura 22b**). Además, los datos revelaron que no había diferencias significativas en la formación de AFG en células 3T3 Rnd3 KO en comparación con células 3T3 WT (**Figura 22c**). Por último, el reciclaje de estas partículas autofágicas (flujo de LC3 y flujo neto de LC3), incrementó significativamente en ausencia de Rnd3, tanto en condiciones basales como en ausencia de suero (**Figura 22d, e**). Especialmente, las células deficientes en Rnd3 mostraron el doble del flujo neto de LC3 en ausencia de suero respecto a estas mismas células en presencia de suero, mientras que las células 3T3 WT no alcanzaron dicho aumento.

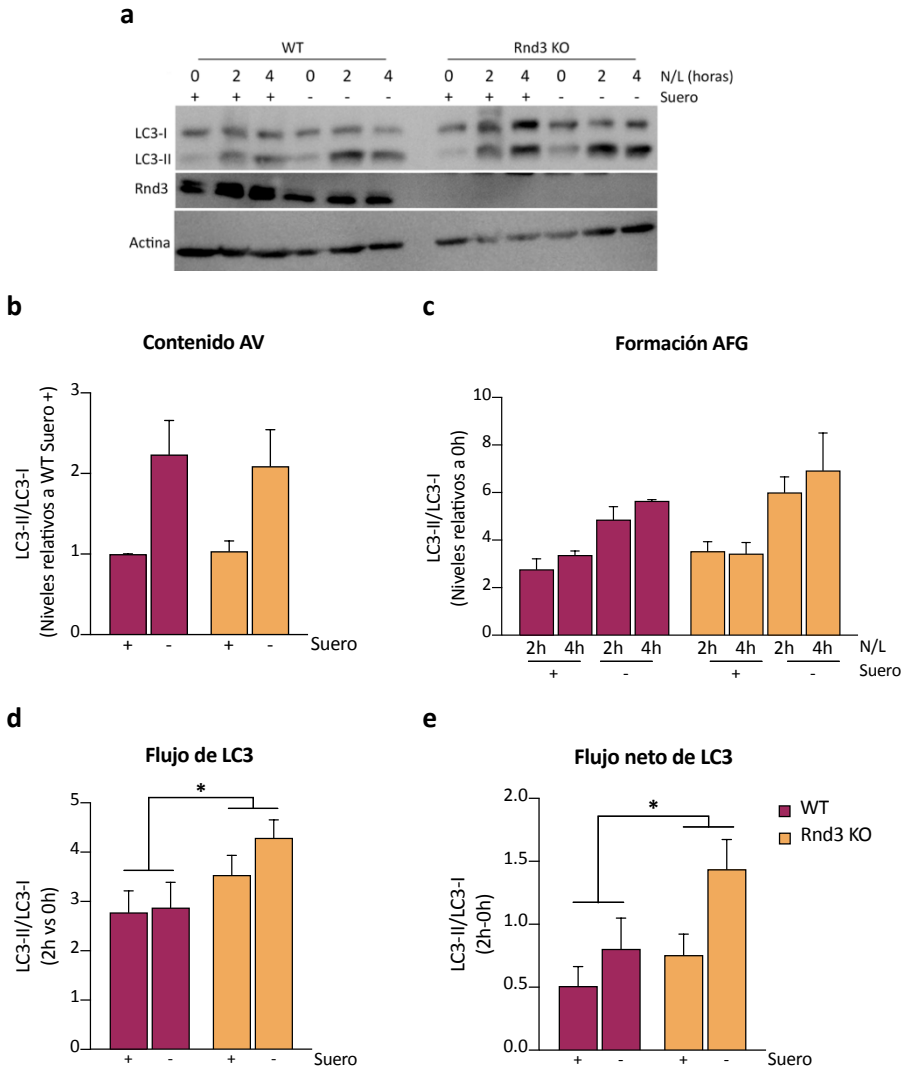


Figura 22. La ausencia de Rnd3 en células 3T3 Rnd3 KO produce un aumento del flujo autofágico. a) Imagen representativa de los niveles de LC3-I y LC3-II analizados por western blot en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero y en presencia o ausencia de NH₄Cl/leupeptina (N/L). Las gráficas representan la cuantificación por densitometría de la relación LC3-II/LC3-I. Con los datos obtenidos se calculó el contenido total de AV (b), la formación de AFG (c), el flujo de LC3 (d) y el flujo neto de LC3 (e). El ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos tanto en el flujo de LC3 como en el flujo neto de LC3 (n=6).

Para poder confirmar que los cambios en autofagia observados eran consecuencia directa de la ausencia de Rnd3, decidimos realizar un ensayo de flujo autofágico en células 3T3 Rnd3 KO a las que reintroducimos de nuevo el gen *RND3* mediante la transfección del plásmido pCMVFlag-GFP-Rnd3. (FlagGFP-Rnd3) (ver Material y Métodos). Tras 48 horas de la transfección se comprobó la eficiencia de la misma mediante microscopía de fluorescencia y se procedió a realizar el análisis de la relación LC3-II/LC3-I, así como de Rnd3 exógeno mediante western blot (**Figura 23a**). Los resultados obtenidos indicaron, en primer lugar, que la re-expresión de Rnd3 no alteraba el contenido de AV, presentando un comportamiento similar al que se ha detallado anteriormente tanto en los MEFs como en las células 3T3 (**Figura 23b**). En cuanto a la formación de AFG, se observó que al re-expresar Rnd3 en células 3T3 Rnd3 KO, se recuperaba parte del fenotipo autofágico. Es decir, el aumento observado en la formación de AFG en ausencia de Rnd3 disminuía a la mitad en células 3T3 Rnd3 KO que re-expresaban Rnd3, obteniendo, por tanto, valores similares a lo observado en células 3T3 WT (**Figura 23c**). Además, en cuanto al reciclaje de estas partículas, se observó que al recuperar la expresión de Rnd3 en células 3T3 Rnd3 KO, los niveles del flujo de LC3 disminuyeron 3 veces respecto a células 3T3 Rnd3 KO y 2 veces respecto a células 3T3 WT (**Figura 23d**). Finalmente, el flujo neto de LC3 no mostró diferencias significativas al re-expresar Rnd3 en células 3T3 Rnd3 KO, aunque presentaron una tendencia similar al de células 3T3 WT (**Figura 23e**).

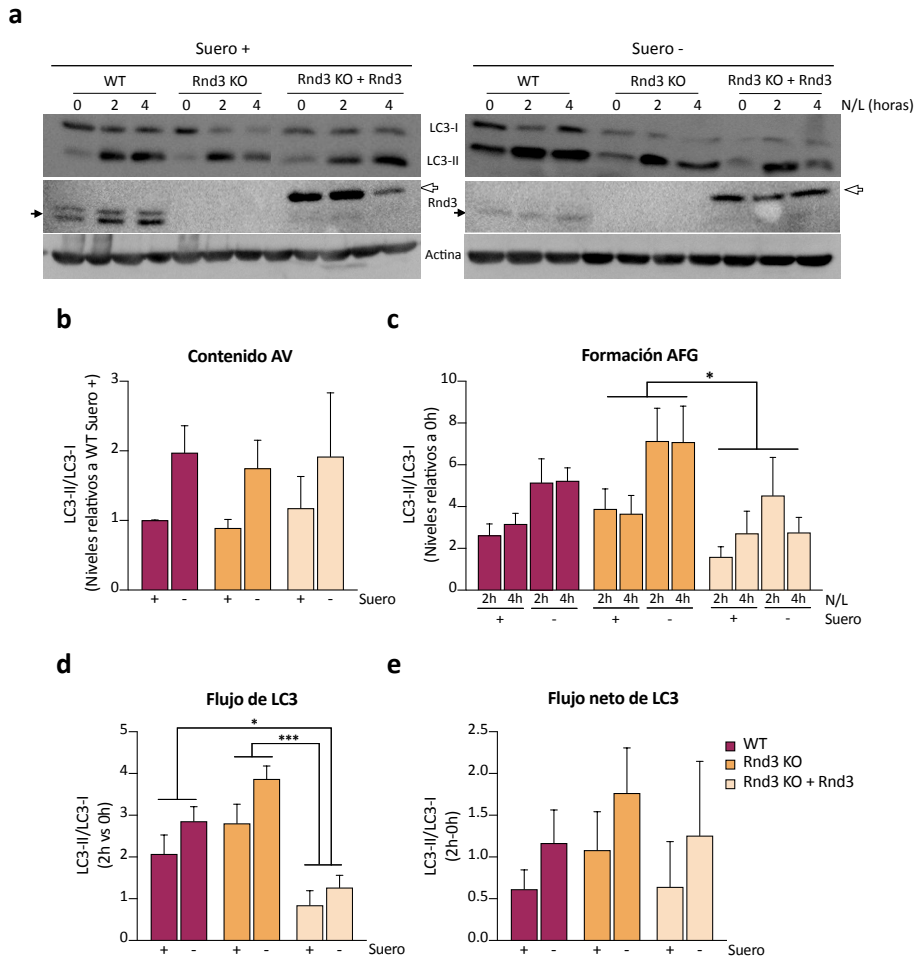


Figura 23. La expresión exógena de la proteína Rnd3 restablece el flujo autofágico en células 3T3 Rnd3 KO. a) Imagen representativa de los niveles de LC3-I y LC3-II, analizados por western blot en células 3T3 WT, 3T3 Rnd3 KO y 3T3 Rnd3 KO transfectadas con el plásmido FlagGFP-Rnd3. La expresión de Rnd3 se indica con una flecha negra, mientras que la expresión de Rnd3 exógeno (Flag-Rnd3) se indica con una flecha blanca. Las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero y en presencia o ausencia de NH_4Cl /leupeptina (N/L). Las gráficas representan la cuantificación por densitometría de LC3-II/LC3-I. Con los datos resultantes se calculó el contenido total de AV (b), la formación de AFG (c), el flujo de LC3 (d) y el flujo neto de LC3 (e) tal y como se detalla en Material y Métodos. El ANOVA mostró diferencias significativas entre células 3T3 Rnd3 KO y células 3T3 Rnd3 KO transfectadas con FlagGFP-Rnd3 en la formación de AFG y en el flujo de LC3 ($n=2$).

Dado que los resultados anteriores mostraban que la ausencia de Rnd3 producía un aumento en la tasa de degradación de proteínas así como un aumento en el flujo autofágico, nuestro siguiente objetivo fue analizar si el tipo de sustrato a degradar en estas células era o no dependiente del principal receptor de sustrato en autofagia, p62/SQSTM1 (referido a partir de ahora como p62). Para ello, las células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO se cultivaron en presencia o ausencia de suero durante 6 horas, en combinación con NH_4Cl /Leupeptina (últimas 2 horas del experimento), y se analizaron los niveles de expresión de p62 mediante western blot (**Figura 24a**). Los resultados obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas en los niveles de expresión de p62 en células 3T3 Rnd3 KO comparadas con células 3T3 WT (**Figura 24b**). Asimismo, decidimos analizar, mediante western blot, otro marcador implicado en autofagia, Atg5 (**Figura 24a**), imprescindible para la formación del AFG. Los datos obtenidos mostraron que no existían diferencias significativas en ausencia de Rnd3 para los niveles de expresión de Atg5 (**Figura 24c**).

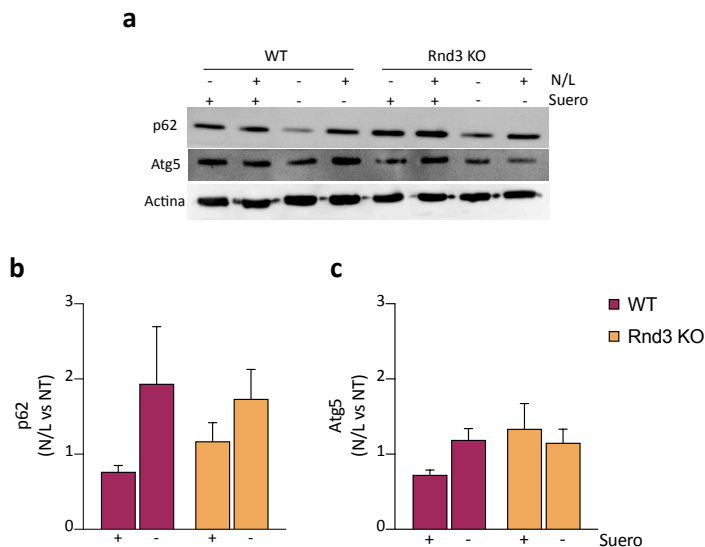


Figura 24. La ausencia de Rnd3 no altera la expresión de p62 y Atg5. a) Imagen representativa de los niveles de expresión de p62 y Atg5, analizados por western blot y utilizando actina como control de carga. Células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero, así como en presencia (N/L) o ausencia (NT) de NH_4Cl /Leupeptina. Se cuantificaron los niveles de p62 (b) y Atg5 (c) y se normalizaron respecto al control de carga (actina). El ANOVA no mostró diferencias significativas entre genotipos (n=3).

A continuación, decidimos analizar otros marcadores implicados en un tipo específico de autofagia, la autofagia mediada por chaperonas (CMA). Al igual que en el caso anterior, las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero durante 6 horas y en presencia o ausencia de NH_4Cl /Leupeptina. Posteriormente, se analizaron, mediante western blot, los niveles de Lamp2A (Lamp2A), marcador lisosomal que permite la internalización de sustratos proteicos en el lisosoma, y Hsc70, chaperona que lleva a cabo el direccionamiento de los sustratos proteicos hacia la superficie del lisosoma. Tal y como muestra la **Figura 25**, no encontramos diferencias en ninguno de los dos marcadores entre 3T3 WT y 3T3 Rnd3KO.

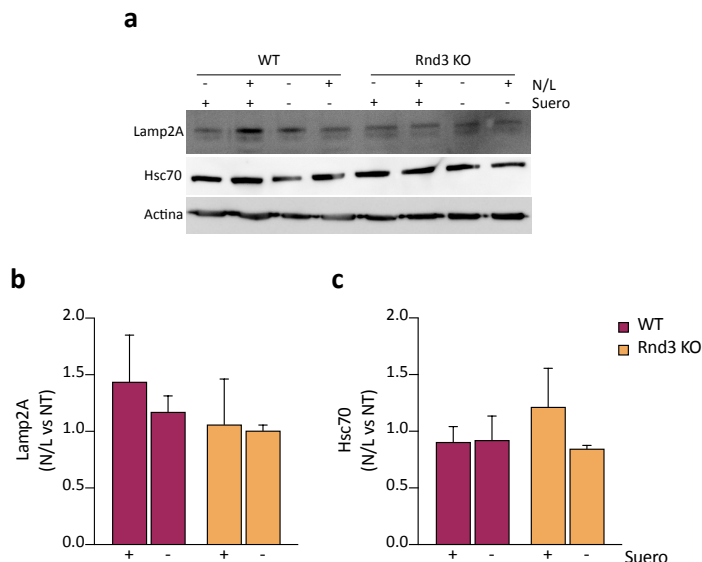


Figura 25. La ausencia de Rnd3 no provoca cambios en la expresión de Lamp2A y Hsc70, marcadores de autofagia mediada por chaperonas (CMA). **a)** Imagen representativa de los niveles de expresión de Lamp2A y Hsc70, analizados por western blot y utilizando actina como control de carga. Células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero, así como en presencia (N/L) o ausencia (NT) de NH₄Cl/Leupeptina. Cuantificación de los niveles de Lamp2A **(b)** y Hsc70 **(c)** normalizados al control de carga (actina). El ANOVA no mostró diferencias significativas entre genotipos (n=3).

En resumen, la re-expresión de Rnd3 en células 3T3 Rnd3 KO restableció la formación de AFG y el flujo autofágico, sugiriendo un papel regulador negativo de Rnd3 sobre autofagia. Por otro lado, el análisis de algunos marcadores específicos de autofagia y CMA no se vieron alterados.

3. La vía mTOR/Ulk no se ve alterada en ausencia de la expresión de Rnd3

Dado que nuestros resultados indicaban que en ausencia de Rnd3 se producía un aumento en autofagia, nuestro siguiente objetivo fue analizar si el aumento de autofagia en Rnd3 tenía lugar a través de la vía canónica de mTOR.

En primer lugar, medimos la actividad de mTOR mediante el estudio de uno de sus sustratos, la proteína P70S6K (*P70 ribosomal S6 kinase*). Para llevar a cabo este análisis, células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero durante 3 y 6 horas. Transcurrido este tiempo se recogieron las muestras y se prepararon para proceder al estudio de los niveles de fosforilación de P70S6K (p-P70S6K) por western blot (**Figura 26a**). Finalmente, se analizó la relación p-P70S6K/P70S6K, siendo menor cuanto más inactivo se encuentra mTOR. Los resultados obtenidos mostraron que, en ausencia de suero, tanto las células 3T3 WT como las 3T3 Rnd3 KO presentaban una disminución significativa de la fosforilación de P70S6K, sugiriendo una menor actividad de mTOR, sin haber diferencias entre los dos genotipos (**Figura 26b**).

Resultados

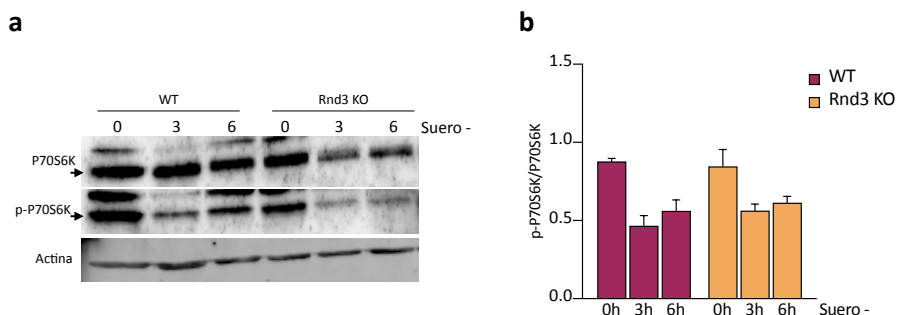


Figura 26. La ausencia de Rnd3 no altera la actividad de mTOR. Las células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO se cultivaron en presencia o ausencia de suero y se analizó la expresión del sustrato de mTOR, P70S6K. **a)** Imagen representativa del estado de fosforilación de P70S6K, (banda marcada con una flecha). Se utilizó actina como control de carga. **b)** Cuantificación de la relación p-P70S6K/P70S6K. El ANOVA no mostró diferencias significativas entre genotipos (n=3).

A continuación, y con el fin de profundizar en los mecanismos de regulación de autofagia mediados por Rnd3, decidimos analizar si Ulk estaba o no implicado en dicha cascada de señalización.

Para realizar este estudio se cultivaron células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO en presencia o ausencia de suero durante 4 horas. Las células se trataron en presencia o ausencia del inhibidor de Ulk1/2 (MRT68), añadiendo bafilomicinaA1 (BafA1) como inhibidor selectivo de la degradación de los AFGL (durante las dos últimas horas del tratamiento). Las muestras se recogieron y se analizó la relación LC3-II/LC3-I mediante western blot (**Figura 27a**). Tal y como se muestra en la **Figura 27b**, la inhibición de Ulk1/2 resultó en una disminución de LC3-II/LC3-I tanto en presencia como en ausencia de suero y tanto en células 3T3 WT como 3T3 Rnd3 KO. Por tanto, estos resultados revelan que el aumento de autofagia en ausencia de Rnd3 es dependiente de Ulk.

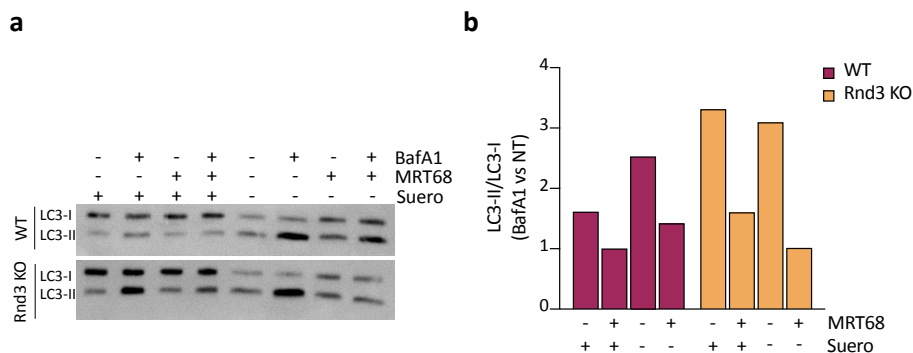


Figura 27. La inhibición de Ulk bloquea autofagia en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO. Células 3T3 WT y Rnd3 KO fueron tratadas en presencia o ausencia del inhibidor de Ulk1/2 (MRT68), con y sin suero, y en presencia o ausencia (NT) de BafA1 como inhibidor de la degradación lisosomal. **a)** Imagen representativa de los niveles de LC3-I y LC3-II analizados por western blot. **b)** Cuantificación de LC3-II/LC3-I en células tratadas con BafA1 respecto a su correspondiente control no tratado (NT) con BafA1 (U. A.).

Es decir, los resultados obtenidos muestran que, el aumento de autofagia observado en células 3T3 Rnd3 KO es dependiente de la vía canónica de señalización de mTOR/Ulk.

4. La inhibición de ROCK-I no produce cambios en el proceso de autofagia en células NIH 3T3

Son varios los estudios que ponen de manifiesto la relación del proceso de autofagia con el citoesqueleto de actina y proteínas de la familia Rho y alguno de sus efectores, tal y como se ha comentado en la Introducción. Además, ROCK-I, un efector de RhoA, ha sido vinculado con el proceso de autofagia y puesto que Rnd3 es un regulador negativo de ROCK, nuestro siguiente

Resultados

propósito fue estudiar si el aumento producido en autofagia en células Rnd3 KO era o no dependiente de ROCK-I.

Para ello, se trataron células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO con el inhibidor de ROCK-I Y-27623 y NH₄Cl/Leupeptina. A continuación, se analizó la relación de LC3-II/LC3-I mediante western blot (**Figura 28a**). Los resultados obtenidos mostraron que tanto en células 3T3 WT como 3T3 Rnd3 KO la presencia del inhibidor de ROCK no producía cambios en la relación LC3-II/LC3-I (**Figura 28b**), sugiriendo que el flujo autofágico en condiciones basales y en ausencia de Rnd3 es independiente de ROCK-I.

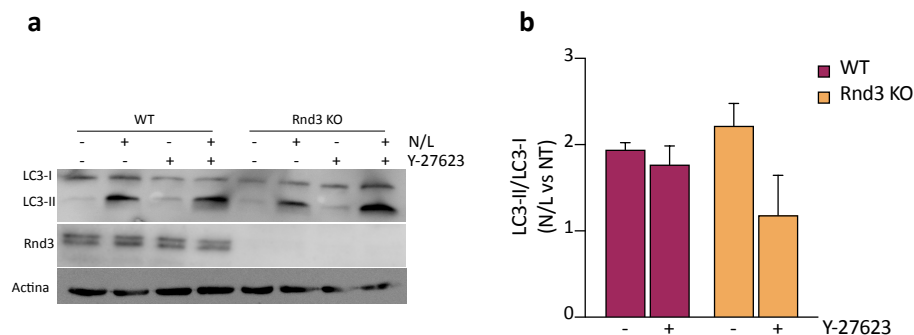


Figura 28. ROCK-I no es un regulador de autofagia en células NIH3T3 en condiciones basales. a) Imagen representativa de los niveles de LC3-I y LC3-II en células 3T3 WT y Rnd3 KO tratadas en presencia o ausencia del inhibidor de ROCK-I, Y-27623, y en presencia o ausencia de NH₄Cl/Leupeptina (N/L). b) Cuantificación de los niveles de LC3-II/LC3-I en presencia de N/L, respecto a células no tratadas (NT). El ANOVA no mostró diferencias significativas entre genotipos (n=2).

5. Rnd3 está presente en la membrana lisosomal pero no es un sustrato de degradación lisosomal

Siguiendo con la caracterización del papel de Rnd3 en autofagia, y puesto que en los análisis de flujo autofágico observamos que Rnd3 podría estar inhibiendo la etapa de maduración del AFG, nos propusimos investigar la localización de Rnd3 en los compartimentos autofágicos y su posible papel en la maduración del AFG.

Primeramente y, en colaboración con el grupo de la Dra. Ana María Cuervo, analizamos la presencia de Rnd3 en lisosomas purificados procedentes de hígados de rata ayunada. Para ello, se obtuvieron fracciones lisosomales enriquecidas, así como de citosol y retículo endoplásmico mediante técnicas de ultracentrifugación, tal y como se detalla en Material y Métodos. Una vez obtenidas las diferentes fracciones, se procedió a analizar, por western blot, la presencia de Rnd3.

Tal y como se observa en la **Figura 29**, Rnd3 se encontraba presente en lisosomas aislados, sugiriendo su participación en la maduración del AFG, o bien que Rnd3 era un sustrato de degradación lisosomal.

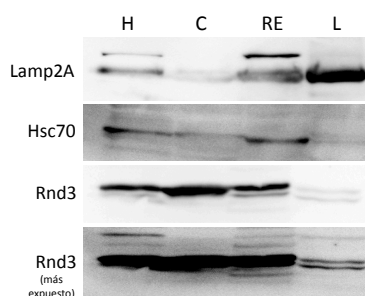


Figura 29. Rnd3 se encuentra en lisosomas purificados de hígado de rata. Las muestras fueron obtenidas a través de técnicas de ultracentrifugación y se analizaron por western blot los niveles de Lamp2A, Hsc70 y Rnd3. H: homogenado total del tejido; C: citosol; RE: retículo endoplásmico; L: lisosomas.

Resultados

Para comprobar si la presencia de Rnd3 en lisosomas era debido a su posterior degradación, realizamos un estudio donde se cultivaron 3T3 WT en presencia de un inhibidor de la ruta proteasomal (lactacistina) o de inhibidores de la degradación lisosomal (NH_4Cl /Leupeptina). Se mantuvieron las células en presencia o ausencia de suero durante 6 y 16 horas, se recogieron las muestras y se estudiaron los niveles de la proteína Rnd3 en cada una de las condiciones mediante western blot (**Figura 30**). Los resultados mostraron que al bloquear la vía del proteasoma, los niveles de Rnd3 se acumulaban de manera significativa. Por el contrario, no se observó una acumulación de la proteína Rnd3 al tratar las células con NH_4Cl /leupeptina (**Figura 30**).

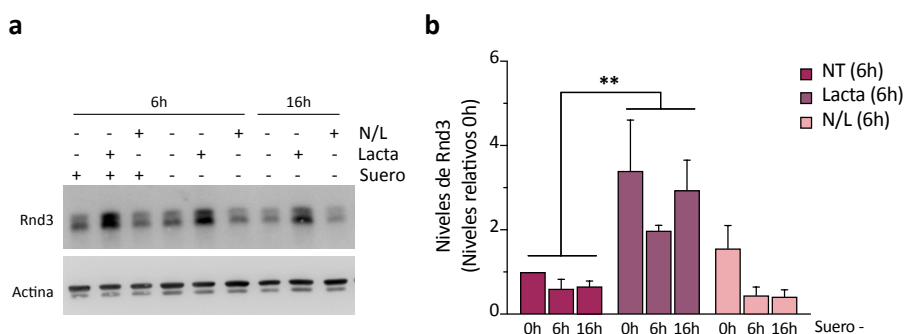


Figura 30. Rnd3 no es degradado a través de autofagia. a) Imagen representativa de los niveles de Rnd3, analizados por western blot, en células 3T3 WT tras el tratamiento con lactacistina (Lacta, $10\mu\text{M}$, 6 horas) como método para inhibir proteasoma, y NH_4Cl /Leupeptina (N/L, 6 horas) como método para inhibir autofagia. Además las células fueron cultivadas en presencia o ausencia de suero (6 y 16 horas). **b)** Cuantificación de los niveles de Rnd3 en cada una de las condiciones. El ANOVA mostró diferencias significativas entre el tratamiento con lactacistina y el grupo no tratado (NT), pero no entre el grupo control y el tratado con inhibidores de la degradación lisosomal (N/L). (n=3)

En conjunto, estos últimos resultados sugieren que Rnd3 no es un sustrato de degradación lisosomal, y que su localización en el lisosoma puede estar relacionada con la regulación de autofagia observada anteriormente.

6. La funcionalidad de las mitocondrias se ve comprometida en ausencia de Rnd3

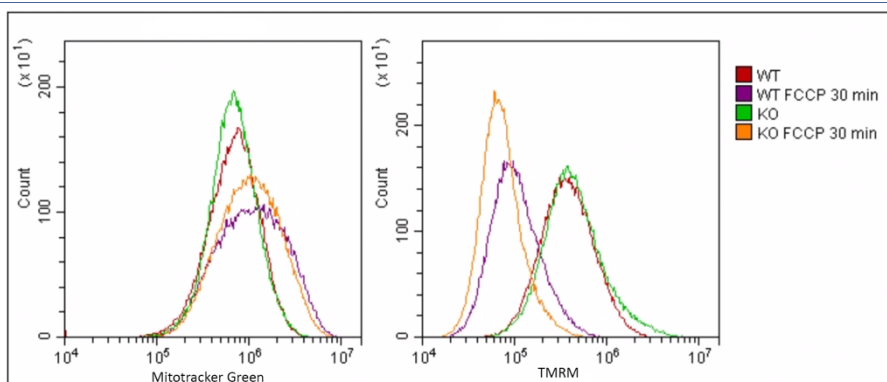
Como se ha comentado en Introducción, resultados previos de nuestro grupo realizados en muestras de cerebro de ratones deficientes en Rnd3 han mostrado la aparición de algunos fenotipos subcelulares compatibles con una alteración en el proceso de autofagia, entre otros, la acumulación de mitocondrias aberrantes. Por este motivo quisimos conocer si Rnd3 estaba o no implicado en la homeostasis mitocondrial.

En primer lugar quisimos analizar el número de mitocondrias totales así como el número de mitocondrias funcionales tanto en células 3T3 WT como en células 3T3 Rnd3 KO.

Para ello se utilizó un marcador que tiñe mitocondrias totales con independencia del potencial de membrana mitocondrial (Mitotracker green) y un marcador sensible a cambios en el potencial de membrana (TMRM), y, por tanto, que nos permite saber el número de mitocondrias funcionales. Las células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron cultivadas en presencia o ausencia de FCCP y en presencia de los distintos marcadores mitocondriales, tal y como se describe en Material y Métodos, y posteriormente se analizaron mediante citometría de flujo.

Los resultados obtenidos indicaron que, en condiciones basales, tanto el número de mitocondrias totales (**Figura 31a**) como el de mitocondrias funcionales (**Figura 31b**) es similar en ambas líneas celulares. Sin embargo, al añadir FCCP, las células Rnd3 KO mostraron una mayor disminución de mitocondrias funcionales comparado con las células WT (11.5% respecto al 27.5% que presentan las células WT tras 15 minutos del tratamiento, **Figura 31c**), indicando que las células Rnd3 KO eran más sensibles a FCCP.

a



b

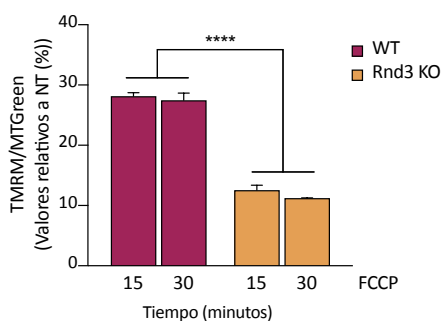


Figura 31. Las células 3T3 Rnd3 KO son más sensibles al daño mitocondrial. Análisis por citometría de flujo del marcador MTGreen (mitocondrias totales) y TMRM (mitocondrias funcionales), tanto en células 3T3 WT como 3T3 Rnd3 KO. **a)** Histograma representando la distribución de la población celular tras el marcaje con MTGreen (izquierda) y con TMRM (derecha), así como la distribución de la población celular tras el tratamiento con FCCP (10 μ M) durante 30 minutos. **b)** Cuantificación de la relación TMRM/MTGreen medidos como la intensidad mediana de fluorescencia. Los datos se expresaron en porcentaje sobre los valores de las células sin tratar con FCCP. El ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos. Las diferencias individuales se analizaron mediante un test de Tukey, observando que el tratamiento con FCCP mostraba diferencias significativas entre genotipos (***) tanto a 15 como a 30 minutos. (n=2).

Resumiendo, estos resultados indican que en ausencia de Rnd3, las células son más sensibles a un daño mitocondrial, lo que sugiere el posible papel de Rnd3 en la homeostasis mitocondrial.

7. La ausencia de Rnd3 produce una alteración de la respiración mitocondrial

Puesto que los resultados obtenidos anteriormente mostraron una mayor sensibilidad a FCCP en células deficientes en Rnd3 comparado con células 3T3 WT, nos preguntamos si dicha alteración podía tener consecuencias en el metabolismo oxidativo de estas células. Para ello evaluamos la tasa de consumo de oxígeno (OCR) en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO (**Figura 32a**) a través del analizador Seahorse, cultivando las células en las distintas condiciones por triplicado y durante 16 horas, tal y como se explica en Material y Métodos. Con los datos obtenidos pudimos calcular el OCR asociado a la producción de ATP (**Figura 32b**) así como la capacidad de máxima respiración (**Figura 32c**).

En primer lugar, observamos que la inhibición de la ATP sintasa con oligomicina provocó una disminución de la bajada del consumo de oxígeno (OCR) en las células 3T3 WT, pero no en las células 3T3 Rnd3 KO. Además, ante la presencia del agente desacoplante FCCP, las células 3T3 Rnd3 KO fueron incapaces de aumentar el consumo de oxígeno, como sí sucede en las células 3T3 WT, mostrando por tanto un descenso significativo en el OCR asociado a la producción de ATP (**Figura 32b**). Asimismo, el hecho de que en ausencia de Rnd3 las células no fueran capaces de aumentar el OCR resultó en una disminución significativa de la capacidad de máxima respiración (**Figura 32c**).

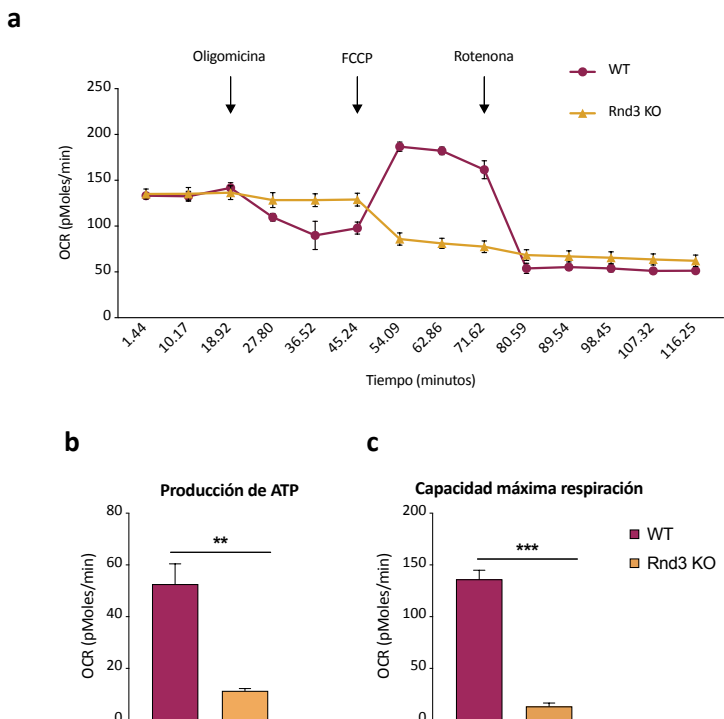


Figura 32. Análisis de la tasa de consumo de oxígeno (OCR) mitocondrial en ausencia de Rnd3. a) Perfil de la tasa de consumo de oxígeno en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO. **b)** Análisis de la capacidad máxima de respiración. **c)** Análisis del consumo de oxígeno asociado a la producción de ATP procedente de la respiración mitocondrial. El análisis estadístico se realizó mediante un test t de Student (n=3).

A continuación, debido a los resultados obtenidos en el análisis del potencial de membrana mitocondrial así como en el OCR, en células 3T3 Rnd3 KO, decidimos analizar el metabolismo glucolítico de estas, también utilizando el analizador metabólico Seahorse. Para ello se cultivaron células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO en las distintas condiciones por triplicado y durante 16 horas, tal y como se explica en Material y Métodos, y se evaluó la tasa de acidificación extracelular (ECAR) tal y como se muestra en la **Figura 33a**. Con los datos obtenidos pudimos calcular la tasa de glucólisis (**Figura 33b**) y la capacidad de reserva glucolítica (**Figura 33c**). De este modo observamos que,

al añadir glucosa, las células 3T3 Rnd3 KO producían un mayor aumento de la acidificación del medio respecto a las células 3T3 WT, indicando una mayor activación de la ruta glucolítica (**Figura 33b**). Por otro lado, las células 3T3 Rnd3 KO no mostraron respuesta a la oligomicina, mientras que en las células 3T3 WT, se observó un aumento de la acidificación del medio tras el bloqueo de la síntesis de ATP mitocondrial, obteniendo en consecuencia una capacidad de reserva glucolítica inferior en células 3T3 Rnd3 KO (**Figura 33c**). Finalmente, la adición al medio de un derivado análogo de la glucosa que inhibe la ruta glucolítica (2-DG) produjo una disminución de la acidificación del medio, tanto en células 3T3 WT como en las 3T3 Rnd3 KO.

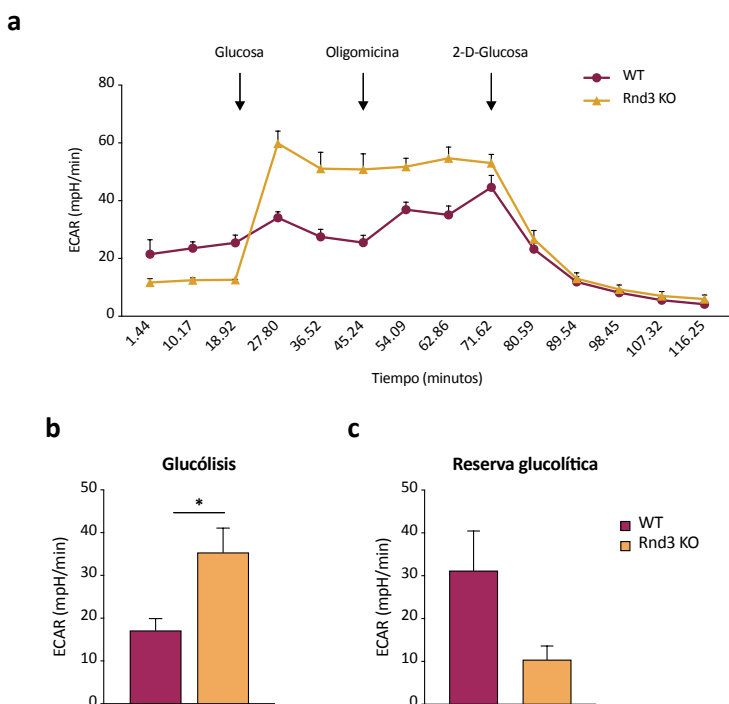


Figura 33. Las células deficientes para Rnd3 presentan un aumento del metabolismo glucolítico. a) Perfil de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) en células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO. **b)** Análisis de la glucólisis. **c)** Análisis de la capacidad de reserva glucolítica. El análisis estadístico se realizó mediante un test *t* de Student ($n=3$).

Por tanto, estos resultados indican una alteración en la respiración mitocondrial de células 3T3 Rnd3 KO y una disminución en la producción de ATP a través de la respiración mitocondrial, lo que hace que estas células aumenten el proceso de la glucólisis como fuente de energía.

8. Las células 3T3 Rnd3 KO son dependientes de glucólisis

Puesto que los resultados obtenidos anteriormente mostraban una alteración en el metabolismo oxidativo de las células deficientes para Rnd3, quisimos confirmar si estas eran dependientes del proceso de glucólisis. Para ello, se realizó un estudio de viabilidad celular en presencia del inhibidor de glucólisis 2-DG, durante 4, 6 y 16 horas, tanto en células 3T3 WT como en las células deficientes para Rnd3 3T3 Rnd3 KO, por triplicado. Transcurrido cada uno de los tiempos, se recogieron las células y se efectuó el conteo tal y como se describe en Material y Métodos. En la **Figura 34**, se observa cómo el tratamiento con 2-DG produjo una reducción moderada de la viabilidad celular en las células 3T3 WT (80%, 60% y 55% a las 4, 6 y 16 horas, respectivamente). Sin embargo, las células deficientes en Rnd3 son mucho más sensibles a la presencia de este compuesto, viendo reducida su viabilidad hasta un 15% tras 16 horas de tratamiento (**Figura 34**), lo que sugiere una mayor dependencia del proceso de glucólisis en estas células.

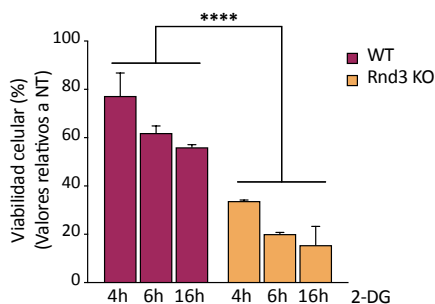
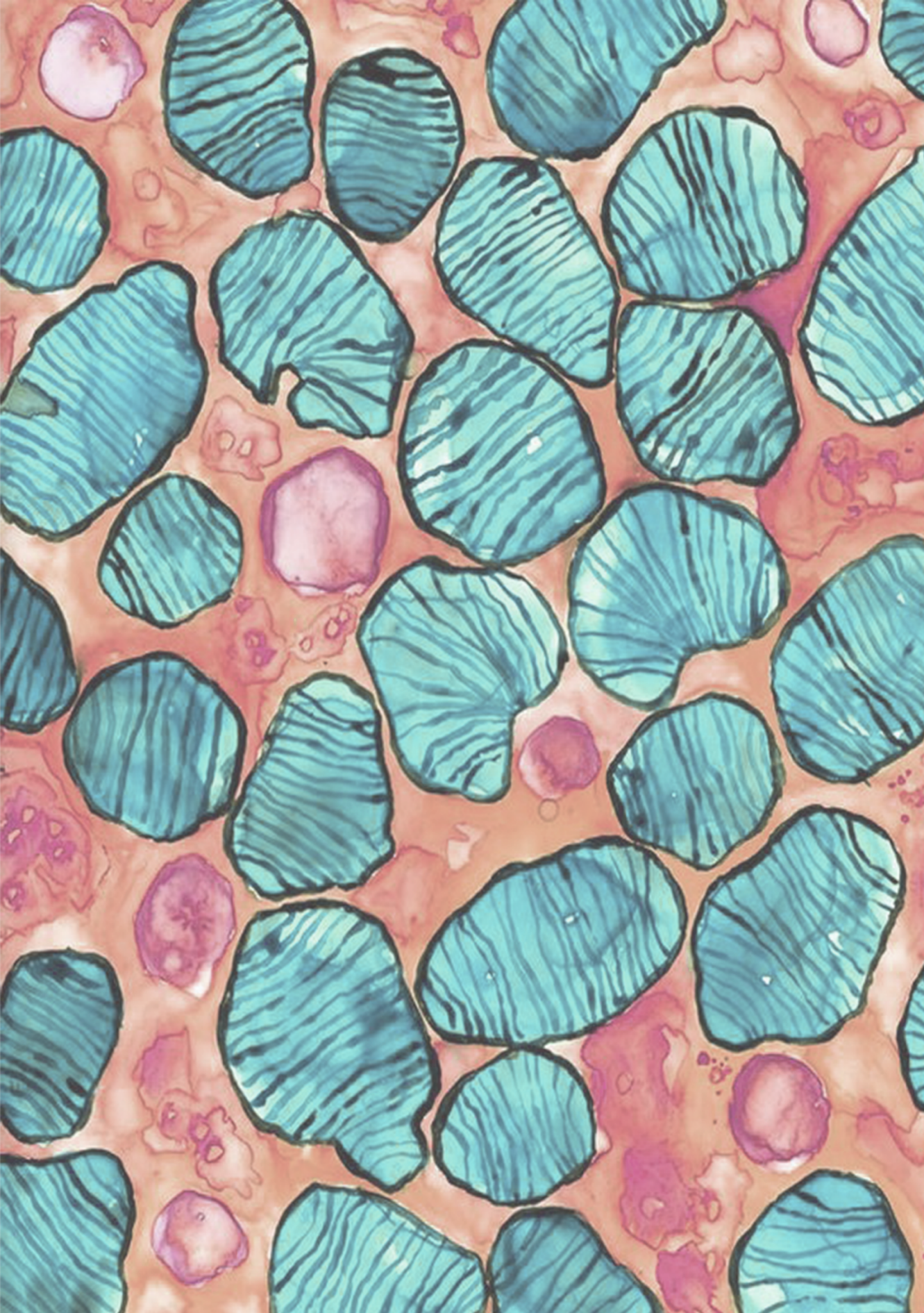


Figura 34. Las células deficientes en Rnd3 son dependientes de glucólisis. Células 3T3 WT y 3T3 Rnd3 KO fueron tratadas con 2-DG (10 mM) durante 4, 6 y 16 horas. Se analizó la viabilidad celular utilizando azul de tripano, obteniendo la media de los triplicados para cada condición y relativizándolo al número de células no tratadas con 2-DG (NT). El ANOVA mostró diferencias significativas entre genotipos. Las diferencias individuales se analizaron mediante de un test de Tukey (* $p < 0.05$ a las 16h del tratamiento; ** $p < 0.01$ a las 4 y 6h del tratamiento). (n=2).

En resumen la ausencia de Rnd3 provoca una disminución de la respiración mitocondrial, así como una dependencia de la vía glucolítica para la obtención de energía.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que Rnd3 es un regulador negativo del proceso de autofagia, pudiendo estar implicado en la etapa de maduración del AFG. Además, las células deficientes en Rnd3 se produce una acumulación de mitocondrias dañadas y por tanto una disminución de la respiración mitocondrial. Por ello, y puesto que no son capaces de obtener ATP a través de la respiración mitocondrial, las células en ausencia de Rnd3 son dependientes de glucólisis.



The background is a watercolor-style illustration. It features numerous irregular, rounded shapes in shades of teal and light blue, each filled with fine, dark, parallel lines. These shapes are scattered across a warm, orange-brown background. Interspersed among the teal shapes are several smaller, more solid-looking shapes in shades of pink, magenta, and light red. The overall effect is a dense, textured pattern.

DISCUSIÓN

La autofagia juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. En particular, un mal funcionamiento de este proceso en el SNC lleva a la acumulación de agregados proteicos, lo que se ha identificado como una de las causas de algunas enfermedades neurodegenerativas⁹². Por otro lado, resultados anteriores de nuestro laboratorio indicaban que el cerebro de ratones deficientes en la expresión de la GTPasa de pequeño tamaño Rnd3 presentaba agregados proteicos y mitocondrias aberrantes. Por ello, en este trabajo hemos analizado el posible papel de Rnd3 en el proceso de autofagia. Nuestros resultados indican que en ausencia de la expresión de Rnd3 hay un aumento del flujo autofágico. Además, Rnd3 se encuentra en las membranas lisosomales, pero no es un sustrato de degradación lisosomal, lo que apoya el posible papel de Rnd3 en la regulación de autofagia. Finalmente, en ausencia de Rnd3 se ve alterada la función mitocondrial y las células se convierten en dependientes de glucólisis. Todos estos resultados sugieren un nuevo papel de Rnd3 como regulador negativo de autofagia así como en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial.

Durante el proceso de autofagia se requiere del remodelado de la membrana para generar vesículas autofágicas (AV), así como su fusión con los lisosomas. En consecuencia, han aparecido diferentes estudios que ponen de manifiesto la relación entre el citoesqueleto de actina y el proceso de autofagia¹¹³ y como la polimerización de actina es esencial para este proceso. De modo que, ante una situación en la que actina se encuentre despolimerizada, la inducción de autofagia no tiene lugar, incluso ante una situación de estrés nutricional¹¹⁵.

La familia de proteínas Rho GTPasas son las principales reguladoras del citoesqueleto de actina,¹²⁵⁻¹²⁸, por lo que otros estudios han demostrado la implicación de algunas de estas proteínas en el proceso de autofagia^{115, 152, 154, 155}. RhoA es un regulador directo de la polimerización de actina^{147, 190} y se ha descrito que la expresión de su forma activa es suficiente para inducir autofagia en condiciones basales¹¹⁵. Por otro lado, la kinasa ROCK-I, el efector

principal de RhoA¹⁴⁷, también está implicada en el proceso de autofagia, aunque su papel no está claro. Así, se ha descrito que la inhibición de ROCK-I resulta en una menor actividad de autofagia. Sin embargo, en presencia de la forma activa de RhoA, la inhibición de ROCK-I no produce cambios en autofagia, sugiriendo que otros efectores de RhoA podrían estar implicados¹¹⁵. Por otro lado, se ha demostrado la implicación directa de ROCK-I sobre autofagia en condiciones de estrés metabólico, a través de Beclin1. La actividad de ROCK-I aumenta ante una situación de estrés metabólico, pudiendo fosforilar a Beclin1 y dando lugar a un aumento de autofagia. Sin embargo, no se observa un incremento en la actividad de RhoA bajo estas condiciones, sugiriendo que otros moduladores de ROCK-I podrían estar implicados¹⁵⁵. Asimismo, otros autores demuestran que la inhibición de la actividad kinasa de ROCK-I promueve la degradación de agregados proteicos a través de autofagia, mediante el receptor de sustrato p62¹⁵⁴, por lo que el papel de ROCK-I sobre autofagia parece ser dependiente de contexto y/o tipo celular.

Rnd3 es un regulador negativo de la vía de señalización de RhoA/ROCK-I^{165,167,168}. En el contexto de autofagia, nuestros resultados indican que en ausencia de expresión de Rnd3 hay un aumento de autofagia, incluso en condiciones basales. La ausencia de Rnd3 produce un aumento de la forma activa de RhoA y de ROCK-I, al menos en neuronas¹⁸¹, lo que podría llevar al aumento de autofagia. Pero, en nuestras condiciones experimentales y en el modelo celular 3T3, la inhibición de ROCK-I no produce cambios en autofagia, ni en ausencia ni en presencia de expresión de Rnd3 en condiciones basales; tampoco observamos cambios en los niveles de p62. Estos resultados podrían sugerir que Rnd3 regula autofagia a través de otras vías de señalización independientes de ROCK-I.

Otras proteínas Rho, como Rac1 y Rac3, están también relacionadas con el proceso de autofagia. Por un lado, se ha descrito un papel negativo de Rac3 en dicho proceso, ya que la ausencia de esta proteína resulta en un aumento

de autofagia¹⁵², al igual que ocurre en nuestros experimentos con Rnd3. No obstante, aunque la vía de señalización por la que Rac3 modula autofagia no se ha descrito, podría ser independiente de RhoA/ROCK-I, ya que la regulación de Rac sobre el citoesqueleto de actina es dependiente de PAK^{152, 191}. Por otro lado, se ha descrito que la forma activa de Rac1 inhibe el proceso de autofagia, ya sea en condiciones basales o ante una situación de estrés nutricional. Así, la expresión de la forma inactiva de Rac1 en condiciones basales, es suficiente para inducir autofagia, alcanzando el mismo nivel de autofagia obtenido ante una situación de estrés nutricional¹¹⁵. No obstante, el papel de Rac1 parece que no está claro, ya que también se ha descrito que en ausencia de esta proteína hay una menor tasa de degradación proteica a través de la vía lisosomal, que no es dependiente de macroautofagia, sino que modula CMA a través de su asociación y estabilización de los lisosomas¹⁵³.

A pesar de que Rac1 y Rac3 tienen un 92% de secuencia de aminoácidos idéntica, presentan funciones opuestas en la regulación del citoesqueleto de actina¹⁹¹. La sobreexpresión de Rac3 en células neuronales produce un fenotipo redondeado, al contrario que ocurre con Rac1 que promueve el crecimiento de neuritas¹⁹². En este sentido, la sobreexpresión de Rnd3 también desorganiza el citoesqueleto de actina produciendo un fenotipo redondeado en células tumorales¹⁷⁴ pero no en células neuronales, donde la sobreexpresión de Rnd3 produce el crecimiento de neuritas¹⁹³. De modo que, la función de Rnd3 puede ser diferente en función del tipo celular, ya que en el caso del crecimiento de neuritas es necesaria la polimerización de actina a través de Rac1, al mismo tiempo que la inhibición de RhoA, actuando Rnd3 como un inhibidor de la vía RhoA/ROCK-I¹⁹³. Además, tal y como se ha comentado anteriormente tanto Rac3 como Rnd3 son reguladores negativos de autofagia. En el caso de Rac1, su principal función es la polimerización de actina dando lugar a lo que se conoce con el nombre de lamelipodios¹¹¹. Sin embargo, Rac1 puede tener un papel antagónico al de RhoA, ya que es capaz de interactuar con p190 RhoGAP provocando una disminución de los

niveles de RhoA activo y modulando de forma transitoria su localización en membrana. La región de interacción de p190 RhoGAP con Rac1 es la misma que para Rnd3¹⁹⁴, de modo que Rac1 y Rnd3 podrían estar inhibiendo el proceso de autofagia a través de la misma vía, es decir, a través de la activación de p190 RhoGAP, con la consiguiente inactivación de la vía RhoA, pero no a través de ROCK-I, sugiriendo que otros efectores de RhoA podrían estar implicados.

Las proteínas Rho GTPasas se localizan en membrana, donde ejercen su función. La presencia en su región C-terminal de una región polibásica y una secuencia CAAX es una característica común en la mayoría de las proteínas Rho. Ambas regiones se han descrito como regiones necesarias para la localización y estabilización de estas proteínas en la membrana celular¹³⁹. El papel de las proteínas Rho sobre autofagia puede estar mediado por esta modificación postraducciona que modula la localización subcelular; en el caso de Rac3, la inhibición de la isoprenilcisteína metiltransferasa, enzima que cataliza el paso final de la prenilación de la proteína y su posterior localización en membrana, produce un aumento de autofagia que es revertido al sobreexpresar Rac3 exógeno¹¹⁵. Rnd3 también presenta la región polibásica así como el motivo CAAX¹³⁸, de modo que el efecto de Rnd3 sobre autofagia podría ser dependiente de su localización en membrana. Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que la ausencia de la región polibásica en la proteína Rnd3 hace que su localización se sitúe fuera de membrana y pierda su función inhibitoria sobre la formación de fibras de actina. Sorprendentemente, el mutante que carece de la región polibásica muestra una localización en lisosomas¹⁹⁵.

Nuestros resultados también indican que Rnd3 se localiza en lisosomas pero no es sustrato de su degradación. Por otro lado, la ausencia de Rnd3 aumenta la degradación lisosomal, confirmando que Rnd3 no se encuentra en lisosomas para ser degradado sino que juega un papel regulador en el proceso de autofagia. La actina polimerizada es fundamental para la

formación de AFG, ya que su despolimerización resulta en la acumulación de estructuras curvadas similares al omegasoma¹¹⁵. El hecho de que Rnd3 induce la despolimerización de la actina, sugiere que esta proteína pueda estar jugando un papel regulador en el proceso de formación de AV. Nuestros resultados indican que Rnd3 es relevante en la última etapa de maduración del AFG, es decir, en la etapa de su fusión con el lisosoma. Es posible que la presencia de Rnd3 en el lisosoma inhiba de forma directa esta fusión, resultando en la acumulación de AFG inmaduros en los que no se lleva a cabo la degradación del contenido. Dado que mutantes de la región polibásica de Rnd3 se localizan en los lisosomas, es posible que modificaciones en la región C-terminal de Rnd3 sean relevantes para modular esta localización en relación con autofagia. También Rac1 se asocia con lisosomas, pero en este caso son lisosomas activos para CMA: la presencia de Rac1 aumenta la estabilidad de este tipo de lisosomas en condiciones de ayuno, a través de su unión con la fosfatasa PHLPP1¹⁵³.

A nivel molecular, se han descrito diferentes rutas de señalización por las cuales se regula autofagia^{196, 197}, siendo la mejor caracterizada la de mTOR, que es un regulador negativo del proceso, ya que lleva a cabo la fosforilación de Ulk, el cual interacciona con otras proteínas formando un complejo esencial para la etapa de iniciación de autofagia^{26, 27, 198}. De modo que, una menor actividad de mTOR tiene como consecuencia una activación de autofagia, tal y como está descrito por otros autores¹⁹⁹. No obstante, se ha descrito que en ausencia de Ulk y ante una situación de hipoxia, se induce el proceso de autofagia, sugiriendo que la autofagia inducida por hipoxia es independiente de Ulk²⁰⁰. Nuestros resultados indican que tanto en células WT como Rnd3 KO, la actividad de mTOR se inhibe ante una situación de estrés nutricional, así como que la inhibición de la actividad de Ulk resulta en una disminución de la relación LC3-II/LC3-I, sugiriendo por tanto que el aumento de autofagia observado en ausencia de Rnd3 no es consecuencia de una nueva vía de señalización, sino que es a través de la vía canónica de mTOR/Ulk.

Nuestros resultados también demuestran que Rnd3 es importante para la homeostasis mitocondrial. La presencia de mitocondrias no funcionales es un fenómeno común a distintas enfermedades neurodegenerativas^{99, 102, 109}. Su acumulación puede provocar muerte celular, dando lugar a los síntomas asociados a dichas enfermedades¹⁰¹. Por ello, el mecanismo por el cual se reciclan las mitocondrias de manera selectiva, denominado mitofagia, se ha convertido en un foco de atención en la investigación de estas enfermedades¹⁰⁷.

La vía de señalización mejor caracterizada para el reciclaje de las mitocondrias es la de PINK1/Parkin²⁰¹, siendo Parkin la proteína más conocida relacionada con la enfermedad de Parkinson. Parkin es una E3 ubiquitina-ligasa imprescindible para la eliminación de mitocondrias aberrantes²⁰². Cuando se produce daño en la mitocondria y se despolariza, la proteína PINK1 se acumula en la membrana externa mitocondrial, reclutando y fosforilando a Parkin, lo que resulta en su activación²⁰³. Parkin, a su vez, ubiquitila a diferentes proteínas en la membrana externa mitocondrial, lo que dirige a las mitocondrias dañadas a ser eliminadas mediante el proceso de mitofagia²⁰⁴. Una de las dianas de PINK1 y Parkin es MIRO (*Mitochondrial Rho protein*), una pequeña GTPasa relacionada con las proteínas Rho y necesaria para el transporte de las mitocondrias en axones. La fosforilación de MIRO induce su unión con Parkin y posterior degradación, lo que resulta en un bloqueo del transporte mitocondrial a lo largo de los axones. Este fenómeno, junto con la activación de PINK1, conduce a la posterior eliminación de las mitocondrias aberrantes a través de mitofagia^{205, 206}.

Nuestros resultados indican que Rnd3 es necesaria para la homeostasis mitocondrial, ya que, en ausencia de Rnd3, el tratamiento con un agente desacoplante aumenta la proporción de mitocondrias despolarizadas, comparado con células WT. La acumulación de mitocondrias aberrantes en cerebro de ratones deficientes en la expresión de Rnd3 podría ser una consecuencia de la incapacidad para eliminarlas en ausencia de esta proteína. En este sentido, es importante señalar que tenemos resultados indicando que

Rnd3 interacciona de forma directa con Fbxo7, una E3 ubiquitina-ligasa relacionada con Parkin y que es también importante para la eliminación de mitocondrias dañadas²⁰⁷. La ausencia de Fbxo7 en ratones presenta un fenotipo similar a nuestro modelo deficiente en Rnd3, incluyendo alteraciones motoras así como una muerte prematura²⁰⁸. Además, la ausencia de Fbxo7 tiene también un efecto sobre el metabolismo mitocondrial, ya que células deficientes en Fbxo7 muestran una alteración de la respiración mitocondrial, con una alteración en la actividad de la NADH deshidrogenasa, lo que resulta en una reducción del potencial de membrana así como una disminución en los niveles de ATP. Asimismo, la capacidad máxima de respiración se ve alterada en células deficientes en Fbxo7²⁰⁹. Por otro lado, mutaciones de Fbxo7 afectan a la integridad mitocondrial, ya que incrementa la especies reactivas de oxígeno (ROS)²¹⁰. Nuestros resultados en células deficientes en Rnd3 muestran un comportamiento similar al detallado para Fbxo7, sugiriendo que Fbxo7 y Rnd3 podrían ser igualmente relevantes en el mantenimiento de la función mitocondrial.

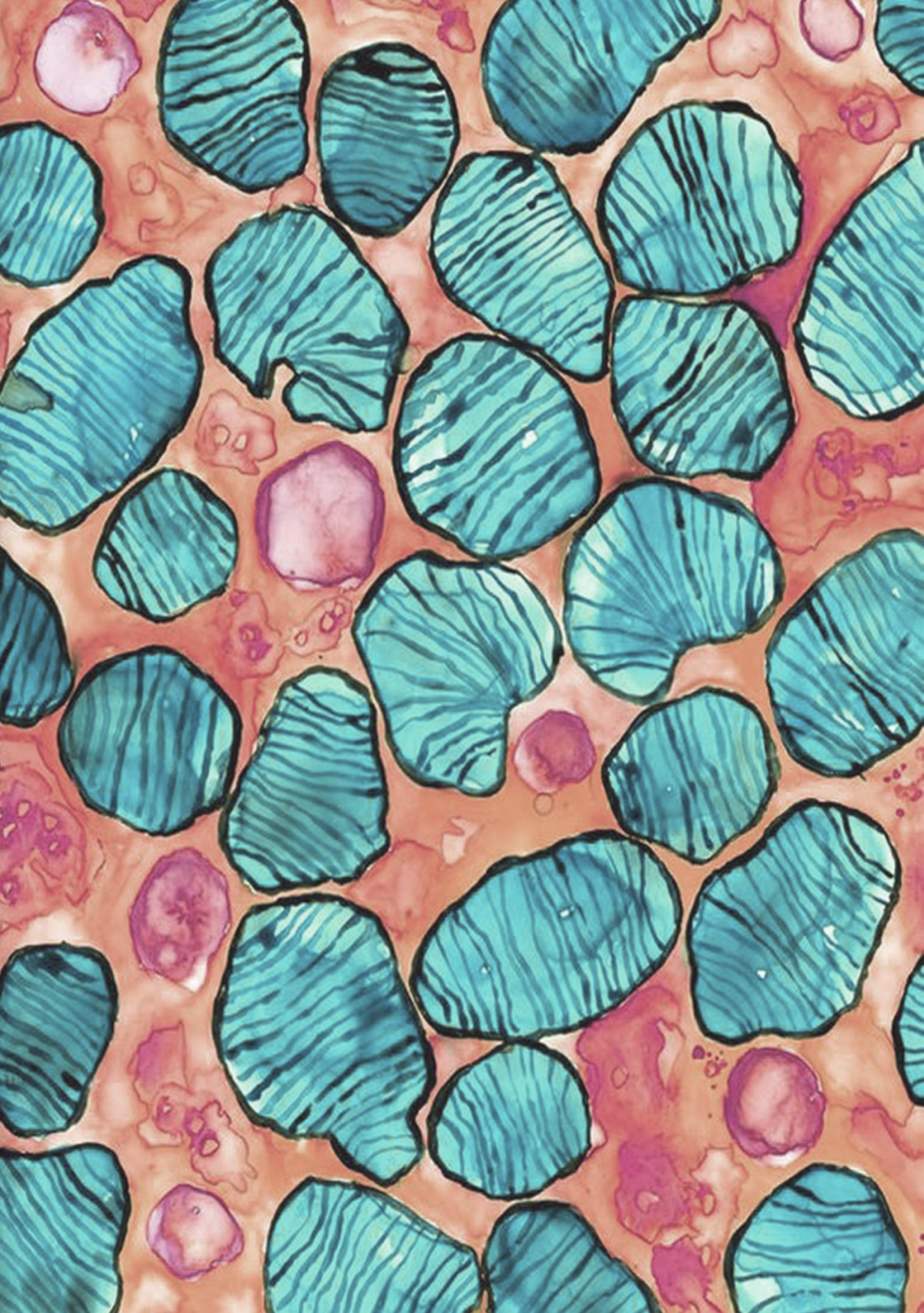
En relación al estado funcional de las mitocondrias en ausencia de Rnd3, éstas muestran un comportamiento normal en situación basal. Sin embargo, hemos observado que en ausencia de Rnd3 se produce una mayor despolarización de las mitocondrias tras el tratamiento con FCCP. Además, respecto a la tasa de consumo de oxígeno, estas células no mostraron ningún efecto al tratamiento con oligomicina, un inhibidor de la ATP sintasa y se observó su incapacidad para aumentar el consumo de oxígeno tras su desacoplamiento con FCCP. La inhibición de la ATP sintasa en ausencia de Rnd3 no resulta en un aumento de la tasa glucolítica, que es mayor que en células WT. Esto significa que Rnd3 es esencial para mantener la homeostasis mitocondrial y que en su ausencia podrían acumularse las mitocondrias no funcionales, por lo que la fosforilación oxidativa deja de ser el principal sistema de síntesis de ATP en la célula. Así, el metabolismo energético de las células deficientes en Rnd3 es estrictamente glucolítico. En concordancia con

estos resultados, las células deficientes en Rnd3 son mucho más sensibles que las WT a la inhibición de glucólisis con 2-desoxiglucosa, ya que esta se convierte en la principal vía metabólica para la obtención de ATP.

La vía de señalización de RhoA/ROCK-I también está relacionada con la función mitocondrial. El tratamiento con lipopolisacárido (LPS), que activa la ruta de señalización RhoA/ROCK-I²¹¹, junto con interferón gamma (IFN- γ), produce una disminución de la respiración mitocondrial y, como consecuencia, un aumento de la tasa glucolítica²¹². En nuestro modelo de ausencia de Rnd3, observamos un fenotipo similar, sugiriendo que Rnd3 podría ser un actor necesario bien para el mantenimiento de la integridad mitocondrial o bien en el proceso de identificación de mitocondrias dañadas y su eliminación por mitofagia, quizás a través de su interacción con Fbxo7. Serán necesarios nuevos experimentos para demostrar esta hipótesis.

En resumen, nuestros resultados indican que Rnd3 juega un papel como regulador negativo del proceso de autofagia y que es fundamental para el mantenimiento de la función mitocondrial en las células. Es posible que Rnd3 interactúe con diversas proteínas, además de con la vía de RhoA para realizar estas funciones. En cualquier caso, este trabajo pone de manifiesto la importancia de Rnd3 en funciones celulares que van más allá de la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina y que impactan en el metabolismo energético y el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial. La pérdida de la función mitocondrial en ausencia de Rnd3 nos lleva a especular con la posibilidad de que Rnd3 actúe regulando la eliminación de mitocondrias dañadas, que se acumulan en su ausencia, limitando la producción de ATP en la mitocondria. No podemos descartar que, ante esta situación de estrés metabólico, se active el proceso de autofagia en las células. Así, el aumento de autofagia que encontramos en las células que no expresan Rnd3 podría ser una consecuencia indirecta de la pérdida de función mitocondrial.

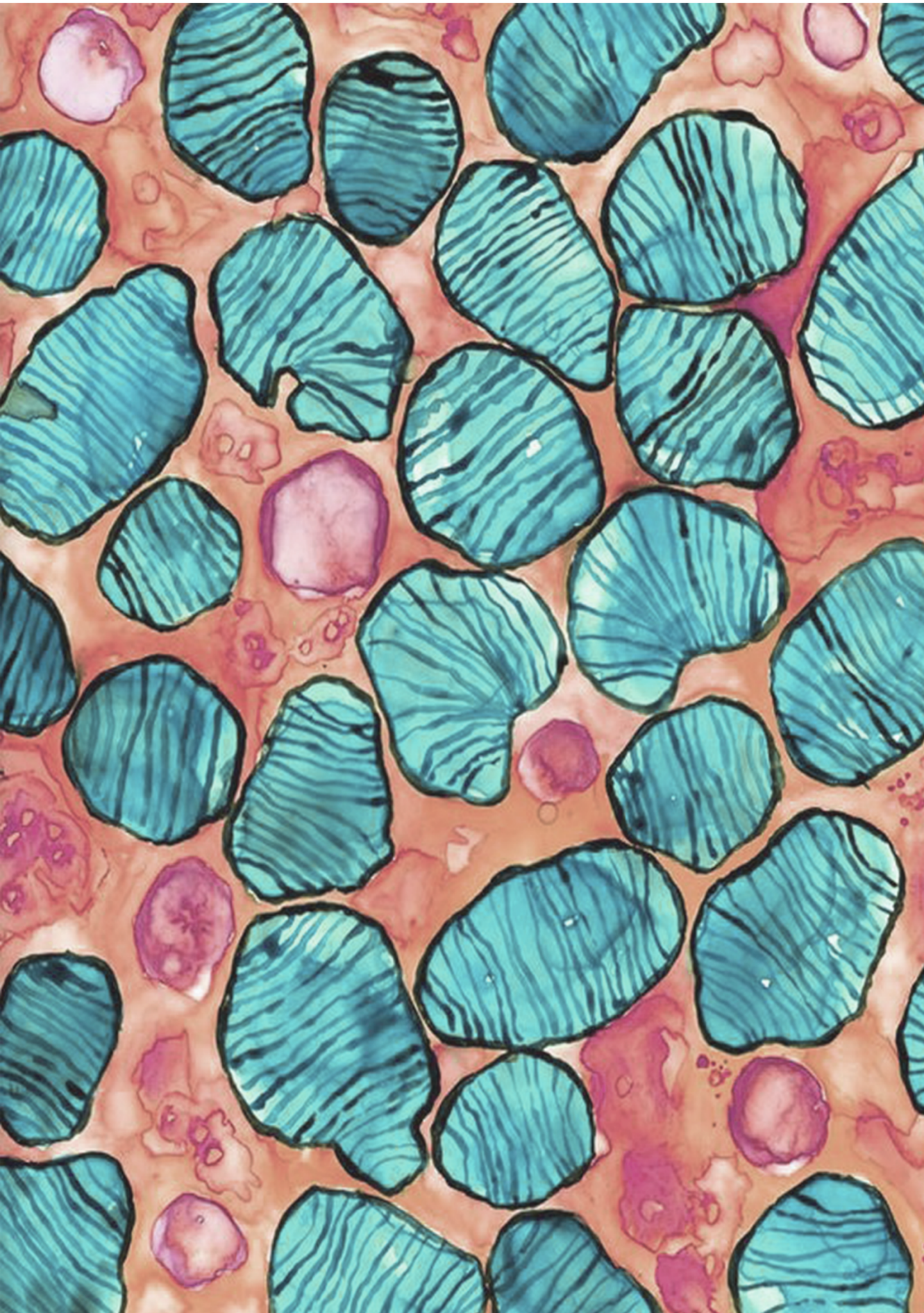
Con los resultados mostrados en este trabajo y teniendo presente el fenotipo de los ratones deficientes en la expresión de esta proteína, con efectos pleiotrópicos, proponemos que dichos efectos pudieran ser debidos al papel de Rnd3 como regulador de estas funciones. Especialmente, los problemas relacionados con el desarrollo del SNC en estos ratones sugieren que Rnd3 puede estar implicado en la aparición y/o progresión de enfermedades neurodegenerativas, abriendo la puerta a nuevas áreas de investigación para el futuro.

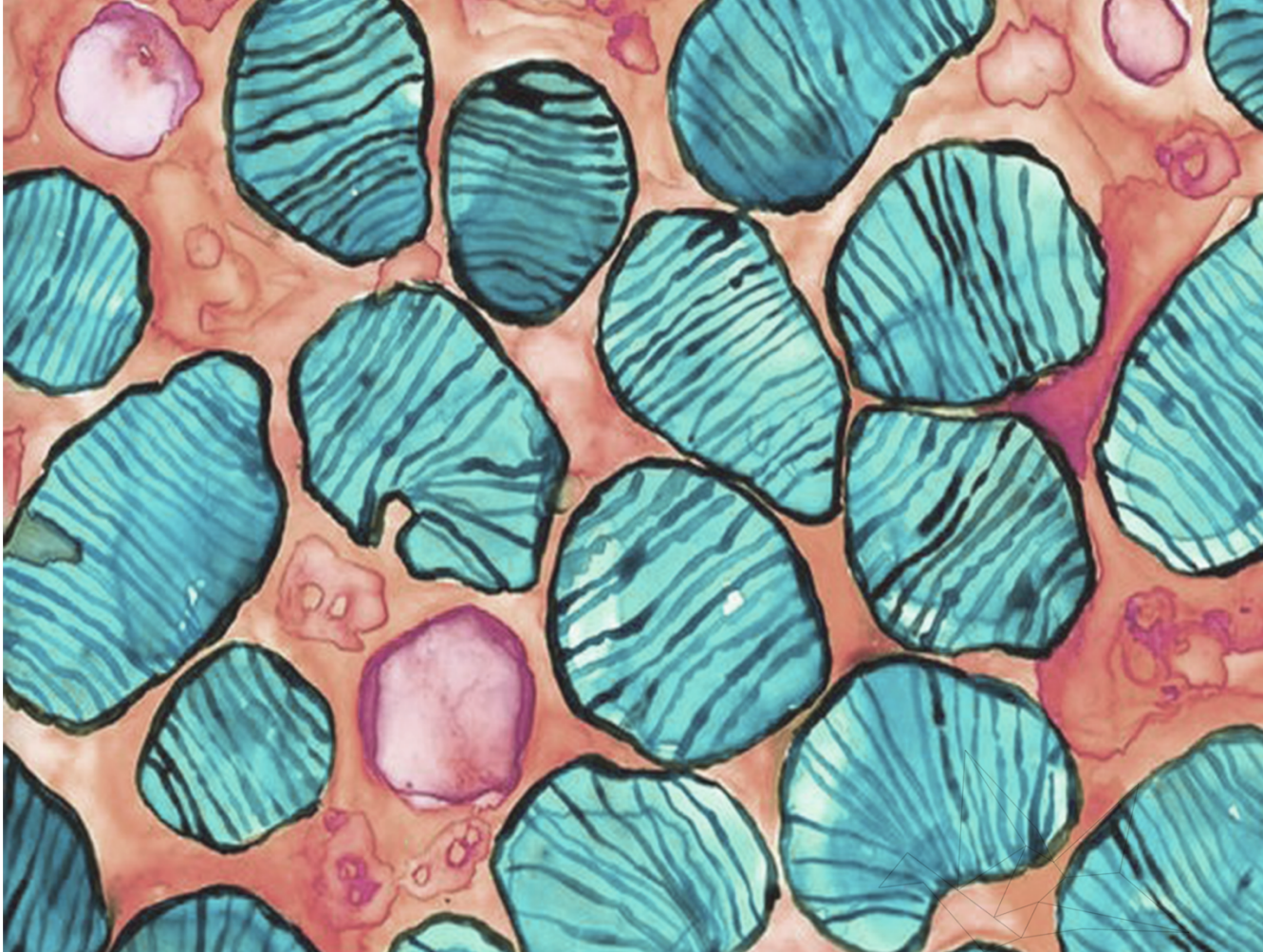




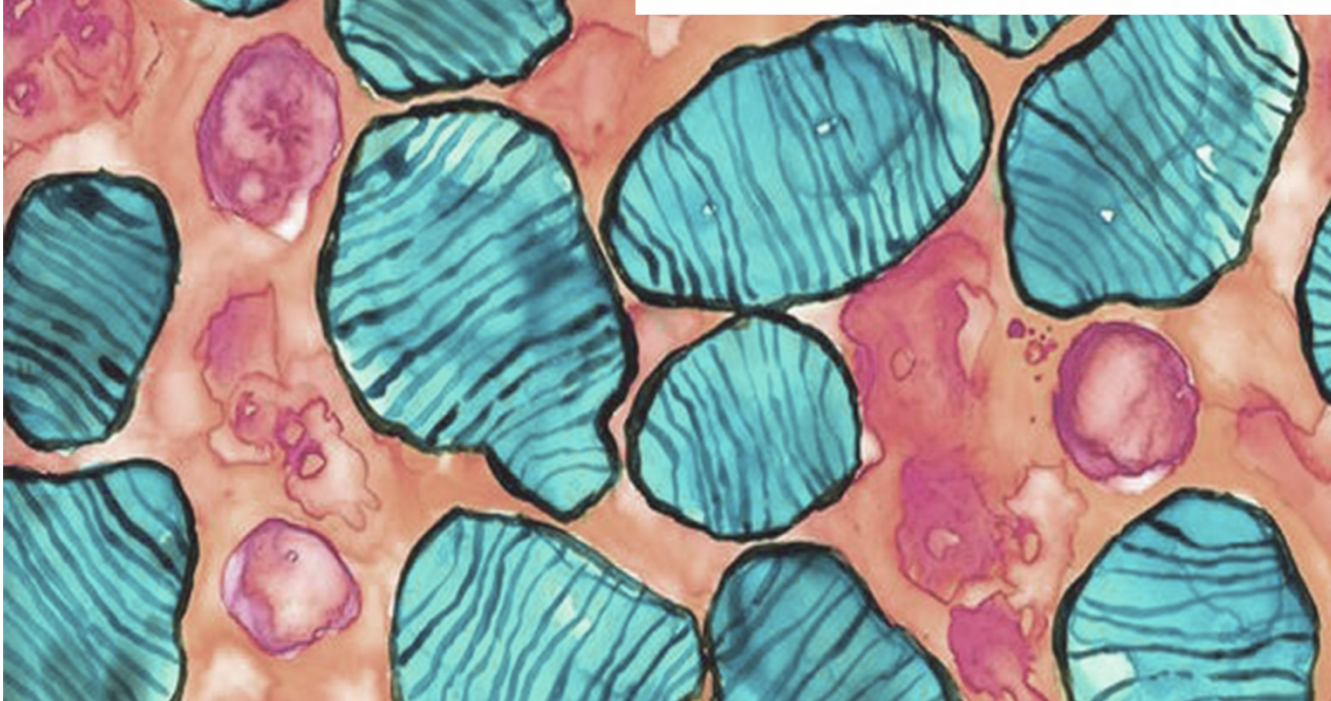
CONCLUSIONES

1. Rnd3 tiene un papel como regulador negativo sobre el proceso de autofagia, participando en la etapa de maduración del autofagosoma.
2. Rnd3 regula autofagia de manera dependiente de mTOR/Ulk
3. Rnd3 tiene un papel protector ante el tratamiento con FCCP, siendo necesario para la función mitocondrial y por tanto para la homeostasis mitocondrial.
4. En ausencia de Rnd3 las células presentan una disminución de la capacidad de producir energía en la mitocondria que se traduce en una mayor dependencia del metabolismo glucolítico.
5. Todos estos resultados demuestran un nuevo papel de Rnd3 en la regulación de autofagia y en el mantenimiento de la homeostasis mitocondrial, lo que podría explicar alguno de los fenotipos observados en el modelo de ratón deficiente en Rnd3.

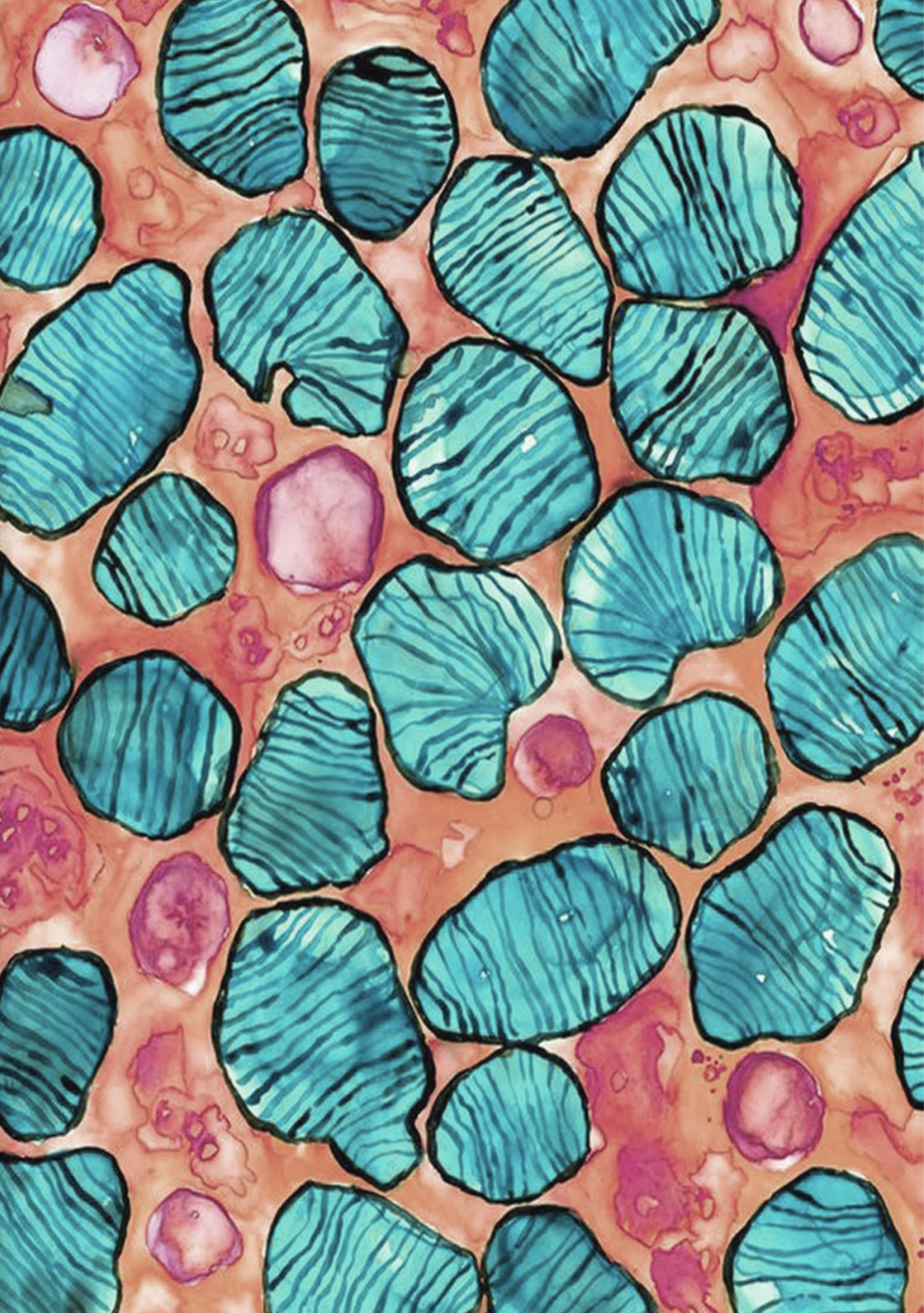




CONCLUSIONS



1. Rnd3 plays a role as a negative regulator in autophagy, affecting the maturation of autophagosomes.
2. Rnd3 regulates autophagy through the mTOR/ULK pathway.
3. Rnd3 protects against FCCP damage on mitochondria, therefore being necessary for mitochondria function and homeostasis.
4. Cells lacking Rnd3 expression show a reduced capacity to produce energy in mitochondria, leading to an increased dependency on glycolysis
5. All these results reveal a new role for Rnd3 in autophagy and in maintaining mitochondria homeostasis, what could explain some of the phenotypes observed in mice lacking Rnd3 expression.





BIBLIOGRAFÍA

1. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3-12 (2010).
2. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* **36**, 1811-1836 (2017).
3. Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**, 1101-1111 (2004).
4. Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1542-1552 (2005).
5. Geronimo-Olvera, C. & Massieu, L. Autophagy as a Homeostatic Mechanism in Response to Stress Conditions in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol* **56**, 6594-6608 (2019).
6. Lee, J.Y. *et al.* HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J* **29**, 969-980 (2010).
7. Kaushik, S., Singh, R. & Cuervo, A.M. Autophagic pathways and metabolic stress. *Diabetes Obes Metab* **12 Suppl 2**, 4-14 (2010).
8. Arias, E. & Cuervo, A.M. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* **23**, 184-189 (2011).
9. Li, W.W., Li, J. & Bao, J.K. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci* **69**, 1125-1136 (2012).
10. Yang, Z. & Klionsky, D.J. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* **12**, 814-822 (2010).
11. Parzych, K.R. & Klionsky, D.J. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* **20**, 460-473 (2014).

12. Orenstein, S.J. & Cuervo, A.M. Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 719-726 (2010).
13. Martinez-Vicente, M. & Cuervo, A.M. Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol* **6**, 352-361 (2007).
14. Weidberg, H., Shvets, E. & Elazar, Z. Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* **80**, 125-156 (2011).
15. Stolz, A., Ernst, A. & Dikic, I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol* **16**, 495-501 (2014).
16. Nikolettou, V., Papandreou, M.E. & Tavernarakis, N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell Death Differ* **22**, 398-407 (2015).
17. Delorme-Axford, E., Guimaraes, R.S., Reggiori, F. & Klionsky, D.J. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of methods to study autophagy progression. *Methods* **75**, 3-12 (2015).
18. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**, 169-174 (1993).
19. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728-741 (2011).
20. Pyo, J.O., Nah, J. & Jung, Y.K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* **44**, 73-80 (2012).
21. Russell, R.C., Yuan, H.X. & Guan, K.L. Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* **24**, 42-57 (2014).
22. Polson, H.E. *et al.* Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506-522 (2010).

23. Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. & Ohsumi, Y. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**, 245-250 (1997).
24. Scott, R.C., Juhasz, G. & Neufeld, T.P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol* **17**, 1-11 (2007).
25. Papinski, D. & Kraft, C. Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9. *Autophagy* **10**, 1338-1340 (2014).
26. Jung, C.H., Ro, S.H., Cao, J., Otto, N.M. & Kim, D.H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* **584**, 1287-1295 (2010).
27. Zachari, M. & Ganley, I.G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* **61**, 585-596 (2017).
28. Carlsson, S.R. & Simonsen, A. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci* **128**, 193-205 (2015).
29. Karanasios, E. *et al.* Autophagy initiation by ULK complex assembly on ER tubulovesicular regions marked by ATG9 vesicles. *Nat Commun* **7**, 12420 (2016).
30. Axe, E.L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **182**, 685-701 (2008).
31. Hailey, D.W. *et al.* Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**, 656-667 (2010).
32. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D.C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12**, 747-757 (2010).
33. Ge, L., Melville, D., Zhang, M. & Schekman, R. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* **2**, e00947 (2013).

34. Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K. & Rubinsztein, D.C. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154**, 1285-1299 (2013).
35. Schmelzle, T. & Hall, M.N. TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**, 253-262 (2000).
36. Kahn, B.B. & Myers, M.G., Jr. mTOR tells the brain that the body is hungry. *Nat Med* **12**, 615-617 (2006).
37. Karanasios, E. *et al.* Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci* **126**, 5224-5238 (2013).
38. Papinski, D. & Kraft, C. Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1/ULK1 Complex. *J Mol Biol* **428**, 1725-1741 (2016).
39. Puente, C., Hendrickson, R.C. & Jiang, X. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem* **291**, 6026-6035 (2016).
40. Brown, E.J. *et al.* A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature* **369**, 756-758 (1994).
41. Chen, R. *et al.* The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J Cell Biol* **206**, 173-182 (2014).
42. Jung, C.H. *et al.* ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell* **20**, 1992-2003 (2009).
43. Mizushima, N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 132-139 (2010).
44. Burman, C. & Ktistakis, N.T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett* **584**, 1302-1312 (2010).

45. Funderburk, S.F., Wang, Q.J. & Yue, Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol* **20**, 355-362 (2010).
46. Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T. & Tang, D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* **18**, 571-580 (2011).
47. Matsunaga, K. *et al.* Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* **190**, 511-521 (2010).
48. Yu, L., Chen, Y. & Tooze, S.A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy* **14**, 207-215 (2018).
49. Geng, J. & Klionsky, D.J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep* **9**, 859-864 (2008).
50. Nakatogawa, H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem* **55**, 39-50 (2013).
51. Hanada, T. *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* **282**, 37298-37302 (2007).
52. Klionsky, D.J. & Schulman, B.A. Dynamic regulation of macroautophagy by distinctive ubiquitin-like proteins. *Nat Struct Mol Biol* **21**, 336-345 (2014).
53. Mizushima, N., Noda, T. & Ohsumi, Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J* **18**, 3888-3896 (1999).
54. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. & Ohsumi, Y. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem* **277**, 18619-18625 (2002).

55. Romanov, J. *et al.* Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* **31**, 4304-4317 (2012).
56. Dooley, H.C. *et al.* WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* **55**, 238-252 (2014).
57. Nishida, Y. *et al.* Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**, 654-658 (2009).
58. Ma, T. *et al.* Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat Cell Biol* **17**, 1379-1387 (2015).
59. Satoo, K. *et al.* The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J* **28**, 1341-1350 (2009).
60. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720-5728 (2000).
61. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* **36**, 2503-2518 (2004).
62. Otomo, C., Metlagel, Z., Takaesu, G. & Otomo, T. Structure of the human ATG12~ATG5 conjugate required for LC3 lipidation in autophagy. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 59-66 (2013).
63. Fujita, N. *et al.* The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* **19**, 2092-2100 (2008).
64. Rubinsztein, D.C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* **22**, R29-34 (2012).
65. Yoshii, S.R. & Mizushima, N. Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci* **18** (2017).

66. Wild, P., McEwan, D.G. & Dikic, I. The LC3 interactome at a glance. *J Cell Sci* **127**, 3-9 (2014).
67. Lamark, T., Kirkin, V., Dikic, I. & Johansen, T. NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* **8**, 1986-1990 (2009).
68. Birgisdottir, A.B., Lamark, T. & Johansen, T. The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* **126**, 3237-3247 (2013).
69. Jahreiss, L., Menzies, F.M. & Rubinsztein, D.C. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**, 574-587 (2008).
70. Korolchuk, V.I. & Rubinsztein, D.C. Regulation of autophagy by lysosomal positioning. *Autophagy* **7**, 927-928 (2011).
71. Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y. & Tooze, S.A. Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes. *Traffic* **7**, 129-145 (2006).
72. Kimura, S., Noda, T. & Yoshimori, T. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* **33**, 109-122 (2008).
73. Kruppa, A.J., Kendrick-Jones, J. & Buss, F. Myosins, Actin and Autophagy. *Traffic* **17**, 878-890 (2016).
74. Nakamura, S. & Yoshimori, T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* **130**, 1209-1216 (2017).
75. Kriegenburg, F., Ungermann, C. & Reggiori, F. Coordination of Autophagosome-Lysosome Fusion by Atg8 Family Members. *Curr Biol* **28**, R512-R518 (2018).
76. Jiang, P. *et al.* The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol Biol Cell* **25**, 1327-1337 (2014).

77. Gutierrez, M.G., Munafo, D.B., Beron, W. & Colombo, M.I. Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* **117**, 2687-2697 (2004).
78. Jager, S. *et al.* Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci* **117**, 4837-4848 (2004).
79. Wang, Y. *et al.* SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. *Semin Cell Dev Biol* **60**, 97-104 (2016).
80. Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**, 1256-1269 (2012).
81. Jia, R., Guardia, C.M., Pu, J., Chen, Y. & Bonifacino, J.S. BORC coordinates encounter and fusion of lysosomes with autophagosomes. *Autophagy* **13**, 1648-1663 (2017).
82. Kumar, S. *et al.* Mechanism of Stx17 recruitment to autophagosomes via IRGM and mammalian Atg8 proteins. *J Cell Biol* **217**, 997-1013 (2018).
83. Diao, J. *et al.* ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* **520**, 563-566 (2015).
84. Liu, R., Zhi, X. & Zhong, Q. ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. *Autophagy* **11**, 847-849 (2015).
85. Lurick, A. *et al.* Multivalent Rab interactions determine tether-mediated membrane fusion. *Mol Biol Cell* **28**, 322-332 (2017).
86. Eskelinen, E.L. & Saftig, P. Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 664-673 (2009).
87. Yu, L. *et al.* Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**, 942-946 (2010).

88. Ariosa, A.R. & Klionsky, D.J. Autophagy core machinery: overcoming spatial barriers in neurons. *J Mol Med (Berl)* **94**, 1217-1227 (2016).
89. Stavoe, A.K.H. & Holzbaur, E.L.F. Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol* **35**, 477-500 (2019).
90. Meng, T. *et al.* Recent progress in the role of autophagy in neurological diseases. *Cell Stress* **3**, 141-161 (2019).
91. Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**, 880-884 (2006).
92. Martinez-Vicente, M. Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Semin Cell Dev Biol* **40**, 115-126 (2015).
93. Terry, R.D. & Davies, P. Dementia of the Alzheimer type. *Annu Rev Neurosci* **3**, 77-95 (1980).
94. Bar-Yosef, T., Damri, O. & Agam, G. Dual Role of Autophagy in Diseases of the Central Nervous System. *Front Cell Neurosci* **13**, 196 (2019).
95. Nixon, R.A. *et al.* Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**, 113-122 (2005).
96. Boland, B. *et al.* Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**, 6926-6937 (2008).
97. Sarkar, C. *et al.* Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy* **10**, 2208-2222 (2014).
98. Pollanen, M.S., Dickson, D.W. & Bergeron, C. Pathology and biology of the Lewy body. *J Neuropathol Exp Neurol* **52**, 183-191 (1993).
99. Rubinsztein, D.C. *et al.* Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy* **1**, 11-22 (2005).

100. Liou, C.W. *et al.* Mitochondrial DNA variants as genetic risk factors for Parkinson disease. *Eur J Neurol* **23**, 1289-1300 (2016).
101. Deas, E., Wood, N.W. & Plun-Favreau, H. Mitophagy and Parkinson's disease: the PINK1-parkin link. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 623-633 (2011).
102. Son, J.H., Shim, J.H., Kim, K.H., Ha, J.Y. & Han, J.Y. Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases. *Exp Mol Med* **44**, 89-98 (2012).
103. Martinez-Vicente, M. *et al.* Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* **13**, 567-576 (2010).
104. Cuervo, A.M. & Zhang, S. Selective autophagy and Huntingtin: learning from disease. *Cell Cycle* **14**, 1617-1618 (2015).
105. Fecto, F. *et al.* SQSTM1 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Arch Neurol* **68**, 1440-1446 (2011).
106. Teyssou, E. *et al.* Mutations in SQSTM1 encoding p62 in amyotrophic lateral sclerosis: genetics and neuropathology. *Acta Neuropathol* **125**, 511-522 (2013).
107. Rodolfo, C., Campello, S. & Cecconi, F. Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int* **117**, 156-166 (2018).
108. Cuyvers, E. *et al.* Genetic variability in SQSTM1 and risk of early-onset Alzheimer dementia: a European early-onset dementia consortium study. *Neurobiol Aging* **36**, 2005 e2015-2022 (2015).
109. Kim, M. *et al.* Mutation in ATG5 reduces autophagy and leads to ataxia with developmental delay. *Elife* **5** (2016).
110. Tang, D.D. & Gerlach, B.D. The roles and regulation of the actin cytoskeleton, intermediate filaments and microtubules in smooth muscle cell migration. *Respir Res* **18**, 54 (2017).

111. Ridley, A.J. Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* **16**, 522-529 (2006).
112. Heasman, S.J. & Ridley, A.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701 (2008).
113. Kast, D.J. & Dominguez, R. The Cytoskeleton-Autophagy Connection. *Curr Biol* **27**, R318-R326 (2017).
114. Izdebska, M., Zielinska, W., Halas-Wisniewska, M. & Grzanka, A. Involvement of Actin in Autophagy and Autophagy-Dependent Multidrug Resistance in Cancer. *Cancers (Basel)* **11** (2019).
115. Aguilera, M.O., Beron, W. & Colombo, M.I. The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* **8**, 1590-1603 (2012).
116. Monastyrska, I. *et al.* Arp2 links autophagic machinery with the actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **19**, 1962-1975 (2008).
117. Kast, D.J., Zajac, A.L., Holzbaur, E.L., Ostap, E.M. & Dominguez, R. WHAMM Directs the Arp2/3 Complex to the ER for Autophagosome Biogenesis through an Actin Comet Tail Mechanism. *Curr Biol* **25**, 1791-1797 (2015).
118. Kast, D.J. & Dominguez, R. WHAMM links actin assembly via the Arp2/3 complex to autophagy. *Autophagy* **11**, 1702-1704 (2015).
119. Coutts, A.S. & La Thangue, N.B. Actin nucleation by WH2 domains at the autophagosome. *Nat Commun* **6**, 7888 (2015).
120. King, J.S. *et al.* WASH is required for lysosomal recycling and efficient autophagic and phagocytic digestion. *Mol Biol Cell* **24**, 2714-2726 (2013).
121. Tang, H.W. *et al.* Atg1-mediated myosin II activation regulates autophagosome formation during starvation-induced autophagy. *EMBO J* **30**, 636-651 (2011).

122. Tumbarello, D.A. *et al.* Autophagy receptors link myosin VI to autophagosomes to mediate Tom1-dependent autophagosome maturation and fusion with the lysosome. *Nat Cell Biol* **14**, 1024-1035 (2012).
123. Zientara-Rytter, K. & Subramani, S. Role of actin in shaping autophagosomes. *Autophagy* **12**, 2512-2515 (2016).
124. Madaule, P. & Axel, R. A novel ras-related gene family. *Cell* **41**, 31-40 (1985).
125. Aspenstrom, P., Ruusala, A. & Pacholsky, D. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res* **313**, 3673-3679 (2007).
126. Sit, S.T. & Manser, E. Rho GTPases and their role in organizing the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **124**, 679-683 (2011).
127. Hall, A. Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* **40**, 1378-1382 (2012).
128. Haga, R.B. & Ridley, A.J. Rho GTPases: Regulation and roles in cancer cell biology. *Small GTPases* **7**, 207-221 (2016).
129. Lopez-Domenech, G. *et al.* Miro proteins coordinate microtubule- and actin-dependent mitochondrial transport and distribution. *EMBO J* **37**, 321-336 (2018).
130. Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-1609 (2002).
131. Bernards, A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 47-82 (2003).
132. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 545-554 (1999).

133. Aspenstrom, P., Fransson, A. & Saras, J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**, 327-337 (2004).
134. Goryachev, A.B. & Leda, M. Autoactivation of small GTPases by the GEF-effector positive feedback modules. *F1000Res* **8** (2019).
135. Chardin, P. Function and regulation of Rnd proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 54-62 (2006).
136. Riou, P., Villalonga, P. & Ridley, A.J. Rnd proteins: multifunctional regulators of the cytoskeleton and cell cycle progression. *Bioessays* **32**, 986-992 (2010).
137. Mocholi, E. *et al.* RhoE deficiency produces postnatal lethality, profound motor deficits and neurodevelopmental delay in mice. *PLoS One* **6**, e19236 (2011).
138. Lonjedo, M. *et al.* The Rho family member RhoE interacts with Skp2 and is degraded at the proteasome during cell cycle progression. *J Biol Chem* **288**, 30872-30882 (2013).
139. Roberts, P.J. *et al.* Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem* **283**, 25150-25163 (2008).
140. Loirand, G., Guilluy, C. & Pacaud, P. Regulation of Rho proteins by phosphorylation in the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc Med* **16**, 199-204 (2006).
141. Buchsbaum, R.J. Rho activation at a glance. *J Cell Sci* **120**, 1149-1152 (2007).
142. Phuyal, S. & Farhan, H. Multifaceted Rho GTPase Signaling at the Endomembranes. *Front Cell Dev Biol* **7**, 127 (2019).

143. Xu, B. *et al.* RhoA/ROCK, cytoskeletal dynamics, and focal adhesion kinase are required for mechanical stretch-induced tenogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* **227**, 2722-2729 (2012).
144. Hall, A. & Nobes, C.D. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 965-970 (2000).
145. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005).
146. Spiering, D. & Hodgson, L. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* **5**, 170-180 (2011).
147. Ohashi, K. *et al.* Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J Biol Chem* **275**, 3577-3582 (2000).
148. Carrier, M.F., Ducruix, A. & Pantaloni, D. Signalling to actin: the Cdc42-N-WASP-Arp2/3 connection. *Chem Biol* **6**, R235-240 (1999).
149. Wirth, A. *et al.* Inhibition of contraction and myosin light chain phosphorylation in guinea-pig smooth muscle by p21-activated kinase 1. *J Physiol* **549**, 489-500 (2003).
150. Yamazaki, D., Oikawa, T. & Takenawa, T. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci* **120**, 86-100 (2007).
151. Brzeska, H., Szczepanowska, J., Matsumura, F. & Korn, E.D. Rac-induced increase of phosphorylation of myosin regulatory light chain in HeLa cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **58**, 186-199 (2004).
152. Zhu, W.L. *et al.* A role for Rac3 GTPase in the regulation of autophagy. *J Biol Chem* **286**, 35291-35298 (2011).
153. Arias, E. *et al.* Lysosomal mTORC2/PHLPP1/Akt Regulate Chaperone-Mediated Autophagy. *Mol Cell* **59**, 270-284 (2015).

154. Mleczak, A., Millar, S., Tooze, S.A., Olson, M.F. & Chan, E.Y. Regulation of autophagosome formation by Rho kinase. *Cell Signal* **25**, 1-11 (2013).
155. Gurkar, A.U. *et al.* Identification of ROCK1 kinase as a critical regulator of Beclin1-mediated autophagy during metabolic stress. *Nat Commun* **4**, 2189 (2013).
156. Goh, L.L. & Manser, E. The GTPase-deficient Rnd proteins are stabilized by their effectors. *J Biol Chem* **287**, 31311-31320 (2012).
157. Lartey, J., Gampel, A., Pawade, J., Mellor, H. & Bernal, A.L. Expression of RND proteins in human myometrium. *Biol Reprod* **75**, 452-461 (2006).
158. McColl, B., Garg, R., Riou, P., Riento, K. & Ridley, A.J. Rnd3-induced cell rounding requires interaction with Plexin-B2. *J Cell Sci* **129**, 4046-4056 (2016).
159. Ballester-Lurbe, B. *et al.* RhoE is spatiotemporally regulated in the postnatal mouse CNS. *Neuroscience* **163**, 586-593 (2009).
160. Azzarelli, R., Guillemot, F. & Pacary, E. Function and regulation of Rnd proteins in cortical projection neuron migration. *Front Neurosci* **9**, 19 (2015).
161. Hernandez-Sanchez, M. *et al.* RhoE is required for contact inhibition and negatively regulates tumor initiation and progression. *Oncotarget* **6**, 17479-17490 (2015).
162. Clement, O. *et al.* Rp58 and p27(kip1) coordinate cell cycle exit and neuronal migration within the embryonic mouse cerebral cortex. *Neural Dev* **12**, 8 (2017).
163. Ikenouchi, J. & Aoki, K. Membrane bleb: A seesaw game of two small GTPases. *Small GTPases* **8**, 85-89 (2017).
164. Boureux, A., Vignal, E., Faure, S. & Fort, P. Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**, 203-216 (2007).

165. Wennerberg, K. *et al.* Rnd proteins function as RhoA antagonists by activating p190 RhoGAP. *Curr Biol* **13**, 1106-1115 (2003).
166. Monaghan-Benson, E., Wittchen, E.S., Doerschuk, C.M. & Burridge, K. A Rnd3/p190RhoGAP pathway regulates RhoA activity in idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts. *Mol Biol Cell* **29**, 2165-2175 (2018).
167. Goh, L.L. & Manser, E. The RhoA GEF Syx is a target of Rnd3 and regulated via a Raf1-like ubiquitin-related domain. *PLoS One* **5**, e12409 (2010).
168. Riento, K., Guasch, R.M., Garg, R., Jin, B. & Ridley, A.J. RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* **23**, 4219-4229 (2003).
169. Julian, L. & Olson, M.F. Rho-associated coiled-coil containing kinases (ROCK): structure, regulation, and functions. *Small GTPases* **5**, e29846 (2014).
170. Guasch, R.M., Scambler, P., Jones, G.E. & Ridley, A.J. RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* **18**, 4761-4771 (1998).
171. Riento, K., Villalonga, P., Garg, R. & Ridley, A. Function and regulation of RhoE. *Biochem Soc Trans* **33**, 649-651 (2005).
172. Komander, D., Garg, R., Wan, P.T., Ridley, A.J. & Barford, D. Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. *EMBO J* **27**, 3175-3185 (2008).
173. Villalonga, P., Guasch, R.M., Riento, K. & Ridley, A.J. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation. *Mol Cell Biol* **24**, 7829-7840 (2004).
174. Poch, E. *et al.* RhoE interferes with Rb inactivation and regulates the proliferation and survival of the U87 human glioblastoma cell line. *Exp Cell Res* **313**, 719-731 (2007).

175. Ongusaha, P.P. *et al.* RhoE is a pro-survival p53 target gene that inhibits ROCK I-mediated apoptosis in response to genotoxic stress. *Curr Biol* **16**, 2466-2472 (2006).
176. Zhu, Y. *et al.* The Rho GTPase RhoE is a p53-regulated candidate tumor suppressor in cancer cells. *Int J Oncol* **44**, 896-904 (2014).
177. Paysan, L., Piquet, L., Saltel, F. & Moreau, V. Rnd3 in Cancer: A Review of the Evidence for Tumor Promoter or Suppressor. *Mol Cancer Res* **14**, 1033-1044 (2016).
178. Zhao, H., Yang, J., Fan, T., Li, S. & Ren, X. RhoE functions as a tumor suppressor in esophageal squamous cell carcinoma and modulates the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway. *Tumour Biol* **33**, 1363-1374 (2012).
179. Zhang, C. *et al.* Overexpression of RhoE has a prognostic value in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* **14**, 2628-2635 (2007).
180. Zhou, J. *et al.* RhoE is associated with relapse and prognosis of patients with colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* **20**, 175-182 (2013).
181. Peris, B. *et al.* Neuronal polarization is impaired in mice lacking RhoE expression. *J Neurochem* **121**, 903-914 (2012).
182. Pacary, E. *et al.* Proneural transcription factors regulate different steps of cortical neuron migration through Rnd-mediated inhibition of RhoA signaling. *Neuron* **69**, 1069-1084 (2011).
183. Azzarelli, R. *et al.* An antagonistic interaction between PlexinB2 and Rnd3 controls RhoA activity and cortical neuron migration. *Nat Commun* **5**, 3405 (2014).
184. Ballester-Lurbe, B. *et al.* RhoE deficiency alters postnatal subventricular zone development and the number of calbindin-expressing neurons in the olfactory bulb of mouse. *Brain Struct Funct* **220**, 3113-3130 (2015).

185. Zambrowicz, B.P. *et al.* Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* **392**, 608-611 (1998).
186. Zambrowicz, B.P. & Sands, A.T. Knockouts model the 100 best-selling drugs--will they model the next 100? *Nat Rev Drug Discov* **2**, 38-51 (2003).
187. Pickar-Oliver, A. & Gersbach, C.A. The next generation of CRISPR-Cas technologies and applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 490-507 (2019).
188. Loos, B., du Toit, A. & Hofmeyr, J.H. Defining and measuring autophagosome flux-concept and reality. *Autophagy* **10**, 2087-2096 (2014).
189. Bejarano, E. *et al.* Defective recruitment of motor proteins to autophagic compartments contributes to autophagic failure in aging. *Aging Cell* **17**, e12777 (2018).
190. Lou, Z., Billadeau, D.D., Savoy, D.N., Schoon, R.A. & Leibson, P.J. A role for a RhoA/ROCK/LIM-kinase pathway in the regulation of cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* **167**, 5749-5757 (2001).
191. Hajdo-Milasinovic, A., Ellenbroek, S.I., van Es, S., van der Vaart, B. & Collard, J.G. Rac1 and Rac3 have opposing functions in cell adhesion and differentiation of neuronal cells. *J Cell Sci* **120**, 555-566 (2007).
192. Hajdo-Milasinovic, A., van der Kammen, R.A., Moneva, Z. & Collard, J.G. Rac3 inhibits adhesion and differentiation of neuronal cells by modifying GIT1 downstream signaling. *J Cell Sci* **122**, 2127-2136 (2009).
193. Talens-Visconti, R., Peris, B., Guerri, C. & Guasch, R.M. RhoE stimulates neurite-like outgrowth in PC12 cells through inhibition of the RhoA/ROCK-I signalling. *J Neurochem* **112**, 1074-1087 (2010).
194. Bustos, R.I., Forget, M.A., Settleman, J.E. & Hansen, S.H. Coordination of Rho and Rac GTPase function via p190B RhoGAP. *Curr Biol* **18**, 1606-1611 (2008).
195. Lonjedo, M. (CEU-Cardenal Herrera, Valencia; 2011).

196. Codogno, P., Mehrpour, M. & Proikas-Cezanne, T. Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 7-12 (2011).
197. Dupont, N., Nascimbeni, A.C., Morel, E. & Codogno, P. Molecular Mechanisms of Noncanonical Autophagy. *Int Rev Cell Mol Biol* **328**, 1-23 (2017).
198. Rabanal-Ruiz, Y., Otten, E.G. & Korolchuk, V.I. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem* **61**, 565-584 (2017).
199. Chiang, G.G. & Abraham, R.T. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* **280**, 25485-25490 (2005).
200. Feng, Y. *et al.* Unc-51-like kinase (ULK) complex-independent autophagy induced by hypoxia. *Protein Cell* **10**, 376-381 (2019).
201. Geisler, S. *et al.* The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* **6**, 871-878 (2010).
202. Seirafi, M., Kozlov, G. & Gehring, K. Parkin structure and function. *FEBS J* **282**, 2076-2088 (2015).
203. Koyano, F. *et al.* Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**, 162-166 (2014).
204. Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**, 119-131 (2010).
205. Shlevkov, E., Kramer, T., Schapansky, J., LaVoie, M.J. & Schwarz, T.L. Miro phosphorylation sites regulate Parkin recruitment and mitochondrial motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E6097-E6106 (2016).
206. Safiulina, D. *et al.* Miro proteins prime mitochondria for Parkin translocation and mitophagy. *EMBO J* **38** (2019).

Bibliografía

207. Burchell, V.S. *et al.* The Parkinson's disease-linked proteins Fbxo7 and Parkin interact to mediate mitophagy. *Nat Neurosci* **16**, 1257-1265 (2013).
208. Vingill, S. *et al.* Loss of FBXO7 (PARK15) results in reduced proteasome activity and models a parkinsonism-like phenotype in mice. *EMBO J* **35**, 2008-2025 (2016).
209. Delgado-Camprubi, M., Esteras, N., Soutar, M.P., Plun-Favreau, H. & Abramov, A.Y. Deficiency of Parkinson's disease-related gene Fbxo7 is associated with impaired mitochondrial metabolism by PARP activation. *Cell Death Differ* **24**, 120-131 (2017).
210. Joseph, S., Schulz, J.B. & Stegmuller, J. Mechanistic contributions of FBXO7 to Parkinson disease. *J Neurochem* **144**, 118-127 (2018).
211. Wang, C. *et al.* Inhibition of the Rho/Rho kinase pathway prevents lipopolysaccharide-induced hyperalgesia and the release of TNF-alpha and IL-1beta in the mouse spinal cord. *Sci Rep* **5**, 14553 (2015).
212. Van den Bossche, J. *et al.* Mitochondrial Dysfunction Prevents Repolarization of Inflammatory Macrophages. *Cell Rep* **17**, 684-696 (2016).