



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

*Alteraciones en la degradación intracelular
de proteínas y en la endocitosis en las
lipofuscinosis ceroides neuronales infantil
tardía y juvenil*

PROGRAMA DE DOCTORADO:
BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA E INMUNOLOGÍA

TESIS DOCTORAL

Presentada por: José Manuel Vidal Donet

Dirigida por: Erwin Knecht Roberto y Carmen Aguado Muñoz

Tutor: Juan Saus Mas

2014



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

El Dr. **ERWIN KNECHT ROBERTO**, Investigador Principal del Laboratorio de Degradación Intracelular de Proteínas y Enfermedades Raras del Centro de Investigación Príncipe Felipe y Dra. **CARMEN AGUADO MUÑOZ**, Investigadora CIBER:

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por D. José Manuel Vidal Donet, titulada “Alteraciones en la degradación intracelular de proteínas y en la endocitosis en las lipofuscinoses ceroides neuronales infantil tardía y juvenil”, ha sido realizada bajo su dirección y reúne a nuestro juicio todos los requisitos necesarios para su calificación,

Valencia, julio de 2014

Dr. **Erwin Knecht Roberto**

Dra. **Carmen Aguado Muñoz**

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento antes que nada al doctor Erwin Knecht por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio y poder llevar a cabo este trabajo, por permitirme aprender tantas cosas durante todos estos años y ayudarme a ser más perseverante a la hora de luchar por mis objetivos. También a la doctora Carmen Aguado, por su ayuda y consejos desde que di mis primeros pasos en el laboratorio hasta hoy, especialmente, por su labor como directora de esta tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros de los laboratorios I-08 e I-11, con quienes desde septiembre de 2006 hasta hoy he compartido éxitos, fracasos y por supuesto, muchísimos buenos momentos. En especial a Jaime, por sus consejos y ayuda experimental durante muchos meses y a Ana, Asun, Eva, Félix, Ghita, Mari Paz y Silvia.

A mis amigos de siempre Assia, Bea, Domènec, Javi, José Antonio y Paula, porque aunque la distancia se ha cruzado muchas veces en nuestro camino, siempre he tenido su amistad, su cariño y su apoyo. Entre ellos, quiero dar las gracias especialmente a Assia y a Paula, por su inestimable ayuda justo en el momento en que era más necesaria.

Por supuesto, a mis padres, por su apoyo y su confianza desde siempre en los buenos y malos momentos.

Por último, quiero dar las gracias muy especialmente a mi pareja, Mar, que a lo largo de este último año, y sobre todo durante estos últimos difíciles y agotadores meses, ha estado ahí en todo momento, confiando siempre en mí, apoyándome y haciendo todo lo posible por ayudarme a ver el vaso medio lleno cuando solo podía verlo vacío.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XV
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	3
1.1. Enfermedades de almacenamiento lisosomal	4
1.2. Lipofuscinosis ceroides neuronales	6
1.2.1. LINCL (CLN2)	9
1.2.2. JNCL (CLN3)	11
1.3. Vías de degradación intracelular de proteínas	14
1.3.1. Vías no lisosomales	15
1.3.2. Vías lisosomales	21
1.3.2.1. Mecanismos lisosomales de degradación intracelular de proteínas	22
1.3.2.2. Transporte de enzimas lisosomales y reciclaje de sus receptores	30
1.4. Regulación de la degradación intracelular de proteínas	32
1.5. Planteamiento de objetivos	37
2. METODOLOGÍA	41
2.1. Material	41
2.1.1. Aparatos	41
2.1.2. Líneas celulares	42
2.1.3. Material químico y bioquímico	42
2.1.3.1. Anticuerpos	42
2.1.3.2. Material para electroforesis	43
2.1.3.3. Medios utilizados para cultivos de células animales	43
2.1.3.4. Inhibidores	44
2.1.3.5. Material para microscopía electrónica	44
2.1.3.6. Kits comerciales	45
2.1.3.7. Otros materiales	45
2.2. Métodos	46
2.2.1. Cultivos de células animales	46
2.2.1.1. Obtención de fibroblastos a partir de un explante de piel procedente de un paciente	46
2.2.1.2. Condiciones de cultivo de los fibroblastos	47
2.2.1.3. Condiciones de cultivo de los linfoblastos	48
2.2.2. Morfología lisosomal mediante microscopía electrónica convencional	48
2.2.3. Determinación de la actividad de TPP1	49
2.2.4. Medición de la degradación intracelular de proteínas	50
2.2.5. Cuantificación de la autofagia	51
2.2.5.1. <i>Western-blot</i> de LC3	51

2.2.5.2. Inmunocitoquímica de LAMP1	51
2.2.5.3. Transfección con pEGFP-LC3	52
2.2.5.4. Fluorescencia de monodansilcadaverina	52
2.2.6. Determinación del pH lisosomal	53
2.2.7. Estudio de la ubiquitinación	54
2.2.8. Estudio de la señalización	54
2.2.9. Análisis de la macropinocitosis	55
2.2.10. Análisis de la endocitosis mediada por el receptor de EGF	56
2.2.11. Análisis de la endocitosis mediada por caveolas	58
2.2.12. Análisis del ciclo celular por citometría	58
2.2.13. Medidas del estrés oxidativo y de la actividad catalasa	59
2.2.14. Estudio de la morfología mitocondrial y del potencial de membrana	60
2.2.15. Análisis del retrómero y del transporte de enzimas lisosomales	61
2.2.16. Procedimientos generales	62
2.2.16.1. Obtención de extractos celulares	62
2.2.16.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, inmunotransferencia y <i>Western-blot</i>	62
2.2.16.3. Estadística	63
3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL	67
3.1. Estudio de la degradación intracelular de proteínas en fibroblastos humanos de pacientes de LINCL y JNCL	67
3.1.1. Estudio de las vías lisosomales	68
3.1.1.1. Morfología lisosomal mediante microscopía electrónica	68
3.1.1.2. Análisis de la actividad de la enzima TPP1	69
3.1.1.3. Estudio de la contribución relativa de los lisosomas en general y de la macroautofagia en particular a la degradación intracelular de proteínas	71
3.1.1.4. Estudio de la formación y maduración de los autofagosomas	75
3.1.1.5. pH lisosomal	82
3.1.2. Estudio de la vía ubiquitina-proteasomas	87
3.1.2.1. Análisis de los niveles de poliubiquitinación	88
3.1.2.2. Actividad de los proteasomas	90
3.2. Estudio de algunas de las vías de señalización implicadas en la regulación de la macroautofagia	92
3.3. Análisis de posibles alteraciones en la actividad de vías endocíticas	99
3.3.1. Macropinocitosis	99
3.3.2. Endocitosis mediada por el receptor de EGF	101
3.3.2.1. Internalización del ligando	102
3.3.2.2. Degradación de EGFR	103
3.3.2.3. Reciclaje de EGFR	105
3.3.3. Endocitosis mediada por caveolas	107
3.4. Otras consecuencias de la alteración de la macroautofagia en fibroblastos humanos de pacientes de LINCL y JNCL	108

3.4.1. Alteraciones en el ciclo celular	108
3.4.2. Alteraciones en el transporte de enzimas lisosomales	115
3.4.2.1. CI-MPR	115
3.4.2.2. Retrómero	116
3.4.2.3. Procesamiento de las enzimas lisosomales	119
4. CONCLUSIONES FINALES	125
5. BIBLIOGRAFÍA	129

ABREVIATURAS

3-MA	3-metiladenina
4E-BP1	Proteína 1 de unión al factor de iniciación 4E
AAF-AMC	Ala-Ala-fenil-7-amino-4-metilcumarina
AAPCMK	Ala-Ala-fenil-clorometilcetona
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADP	Adenosina 5'-difosfato
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
ANCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal adulta o CLN4
Arf6	Factor 6 de ADP-ribosilación
ATG	Proteína relacionada con la autofagia
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
ATP13A2	Probable ATPasa 13A2 transportadora de cationes
BSA	Albúmina de suero bovino
BTN1	En <i>S. cerevisiae</i> , gen homólogo a CLN3 de humanos
CCCP	Cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona
CD-MPR	Receptor de la manosa 6-fosfato dependiente de cationes
CHX	Cicloheximida
CI-MPR	Receptor de la manosa 6-fosfato independiente de cationes
CLIC/GEEC	Transportadores independientes de clatrina/compartimentos de endosomas tempranos enriquecidos en GPI
CLN1-CLN14	Genes implicados en cada una de las formas de NCL
Cln3p	Proteína codificada por el gen CLN3
CTSD	Gen de la catepsina D
CTSF	Gen de la catepsina F
DHR-123	Dihidrorrodamina 123
DMSO	Dimetilsulfóxido

EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGF/EGFR	Factor de crecimiento epidérmico/receptor del factor de crecimiento epidérmico
EGFP	Proteína verde fluorescente potenciada
ERK1/2	Proteína quinasa 1/2 activada por señales extracelulares
FBS	Suero bovino fetal
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
Gb3	Globotriaosilceramida
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-1	Monosialotetrahexosilgángliósido
GRN	Gen de la granulina
HE	Hidroetidina
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperacina-N'-2'etanosulfónico
HRP	Peroxidasa de rábano
Hsc70	Proteína constitutiva de choque térmico de 70 kDa
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IgG	Inmunoglobulina G
INCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil o CLN1
IP	Yoduro de propidio
JNCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal juvenil o CLN3
JNK	Quinasa de c-Jun en la región N-terminal
KFERQ	Pentapéptido Lys-Phe-Glu-Arg-Gln
LAMP	Proteína de membrana asociada al lisosoma
LBPA	Ácido lisobisfosfatídico
LC3	Cadena asociada a microtúbulos de cadena ligera 1A/1B 3
LINCL	Lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil tardía o CLN2
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
MEM	Medio mínimo esencial
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
MG132	N-benziloxycarbonilo-leucina-leucina-leucina aldehído

MPR	Receptor de la manosa 6-fosfato
mTOR	Diana sensible a la rapamicina en mamíferos
NCL	Lipofuscinosis ceroides neuronales
N-Suc-LLVY-MCA	N-succinil-leucina-leucina-valina-tirosina-4-metil-cumaril-7-amida
p38α	Proteína quinasa p38 activada por mitógenos
p70 S6K	Quinasa de 70 kDa de la proteína ribosomal S6
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
Pak	Familia de quinasas activadas por p21
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetanosulfonilo
PVDF	Difluoruro de polivinilideno
Rac	Subfamilia de las GTPasas de la familia Rho
Ras	MAPK monomérica con actividad GTPasa
RIPA	NaCl 150 mM, Tris 50 mM, desoxicolato sódico 0,5%, SDS 0,1%, Nonidet P-40 1 % (v/v), pH 8
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SD	Desviación estándar
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS
SNAP	Proteína asociada a sinaptosomas
SNX1, 2, 5 y 6	Nexinas de clasificación 1, 2, 5 y 6
TAPS	Ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico
TBS	Tampón Tris salino (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamida
TGN	Red trans del Golgi
TMRM	Metil éster de tetrametilrodamina
TORC1	Complejo 1 de la diana de la rapamicina

<i>TPP1</i>	Tripeptidil-peptidasa 1
<i>Tris</i>	Tris-hidroximetil-aminometano
<i>Ulk</i>	Quinasa 1 tipo Unc 51
<i>VAMP2</i>	Proteína 2 de membrana asociada a vesículas
<i>Vps26, 29, 35</i>	Proteínas de clasificación vacuolar de 26, 29 y 35 kDa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de la ATP-sintasa mitocondrial.	10
Figura 2.	Modelo esquemático de la proteína Cln3p humana.	13
Figura 3.	Estructura del proteasoma 20S.	15
Figura 4.	Estructura y mecanismo de acción del proteasoma 30S y del proteasoma-PA28.	17
Figura 5.	Principales mecanismos de proteólisis lisosomal.	23
Figura 6.	Esquema general algunas vías endocíticas distintas a la fagocitosis.	27
Figura 7.	Morfología lisosomal característica en fibroblastos control y procedentes de pacientes de lipofuscinosis ceroides neuronales infantil tardía y juvenil.	69
Figura 8.	Medidas de la actividad enzimática <i>in vitro</i> de la TPP1.	71
Figura 9.	Cuantificación de la degradación intracelular de proteínas.	73
Figura 10.	Participación de las vías lisosomales en la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en un medio de alta proteólisis.	74
Figura 11.	La formación de los autofagosomas se encuentra reducida en los fibroblastos CLN2 y CLN3 y en estos últimos también se encuentra retrasada la maduración de los autofagosomas.	76
Figura 12.	El número de vacuolas autofágicas observado en microscopía de fluorescencia es menor en los fibroblastos CLN2 y CLN3 que en las células control.	79
Figura 13.	La masa lisosomal observado mediante microscopía de inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce a la proteína de membrana lisosomal LAMP-1 es menor en los fibroblastos CLN2 y CLN3 que en las células control.	80

Figura 14.	La fluorescencia producida por la monodansilcadaverina muestra un descenso en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con las células control.	81
Figura 15.	Rectas de calibrado realizadas en fibroblastos control incubados a pH entre 4,5 y 7,0 en medio de alta y baja proteólisis.	83
Figura 16.	Los lisosomas procedentes de fibroblastos CLN3 tienen un pH mayor.	84
Figura 17.	Efecto de los diferentes valores de pH sobre la actividad de la TPP1.	86
Figura 18.	No se observan cambios significativos en la poliubiquitinación de proteínas en los fibroblastos CLN2 y CLN3 respecto los controles, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de los proteasomas MG132.	89
Figura 19.	La actividad proteolítica de los proteasomas en los fibroblastos procedentes de pacientes no presenta alteraciones significativas.	90
Figura 20.	Esquema simplificado de algunas las principales proteínas que intervienen en la regulación de la macroautofagia a través de mTOR por hormonas y nutrientes y que se mencionan aquí.	94
Figura 21.	El activador de mTOR, Akt, se encuentra más fosforilado en los fibroblastos CLN3, pero sobre todo, en los CLN2.	95
Figura 22.	Las MAPK p38 α y ERK1/2 se encuentran también significativamente más activadas en los fibroblastos CLN2.	96
Figura 23.	Los sustratos de mTOR, p70 S6K y 4E-BP1 se encuentran significativamente más activados en los fibroblastos CLN2.	97
Figura 24.	La macropinocitosis se encuentra reducida en los fibroblastos CLN2 y, especialmente, en los CLN3.	100

Figura 25.	La macropinocitosis se encuentra disminuida en los fibroblastos CLN2 y CLN3.	100
Figura 26.	La internalización de EGF no presenta cambios significativos en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con los fibroblastos control.	102
Figura 27.	EGFR se acumula en los fibroblastos CLN3.	104
Figura 28.	La fosforilación de EGFR se encuentra aumentada en los fibroblastos CLN3.	105
Figura 29.	El reciclaje de EGFR se encuentra aumentado en los fibroblastos CLN3.	106
Figura 30.	La endocitosis mediada por caveolas no está alterada en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con las células control.	107
Figura 31.	Los fibroblastos CLN3 y, en mayor medida los CLN2, crecen más lentamente que las células control.	109
Figura 32.	Los fibroblastos CLN2 se acumulan en la fase G ₀ /G ₁ .	111
Figura 33.	Los fibroblastos CLN3, y en especial los CLN2, presentan mayores niveles de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno que los fibroblastos control.	112
Figura 34.	Las mitocondrias de los fibroblastos CLN2 y CLN3 no se encuentran significativamente alteradas.	113
Figura 35.	Los fibroblastos CLN2 presentan una actividad catalasa menor que los fibroblastos control.	114
Figura 36.	Los fibroblastos CLN3 presentan una menor degradación del CI-MPR en comparación con los fibroblastos control.	116
Figura 37.	Los fibroblastos CLN3 presentan una menor degradación de los componentes del retrómero en comparación con los fibroblastos control.	117
Figura 38.	El CI-MPR colocaliza más con el TGN en los fibroblastos CLN3 en comparación con los fibroblastos control.	118

- Figura 39. El procesamiento de las procatepsinas L y D en sus correspondientes formas maduras, catepsina L y D, se encuentra disminuido en los fibroblastos CLN3. 120

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Algunas características de las principales variantes de las lipofuscinosis ceroides neuronales.	8
Tabla 2.	Valores de pH lisosomal de los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 cultivados en medio de alta y baja proteólisis.	83

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas de degradación de proteínas en las células operan de manera constante para degradar tanto las proteínas extracelulares que la célula internaliza como las proteínas que la célula sintetiza de manera continua. La velocidad a la que ocurre la degradación de cualquier proteína celular varía dependiendo de su naturaleza, pero también de las condiciones ambientales en las que se encuentre la célula. Así, por ejemplo, cuando las células se encuentran expuestas a un medio de cultivo pobre en nutrientes, la velocidad de degradación del conjunto de sus proteínas aumenta para poder obtener nuevos aminoácidos con los que sintetizar proteínas esenciales para la supervivencia celular o también para obtener energía (Hietakangas & Cohen, 2009; Knecht *et al.*, 2009; Yorimitsu & Klionsky, 2005). La degradación intracelular de proteínas desempeña, mediante unos mecanismos específicos y altamente regulados, un papel muy importante en multitud de procesos celulares tales como la adaptación de la maquinaria enzimática a las condiciones ambientales en que se encuentran las células, el control del tráfico intracelular y del ciclo celular, la regulación de procesos relacionados con la morfogénesis y la diferenciación celular, así como la muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis (Guo *et al.*, 2012; Okayama, 2012; Sobolewska *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012). Además, este proceso es también responsable de la degradación de proteínas «envejecidas» por el uso o alteradas y dañadas por mutaciones, errores en la transcripción y traducción, exposición a la acción oxidativa de los radicales libres, etc. (Li *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011; Son *et al.*, 2011).

Los sistemas de degradación intracelular de proteínas se han dividido de manera clásica en dos grandes grupos: las vías lisosomales y las vías no lisosomales. En las primeras, los lisosomas degradan las proteínas intracelulares por diversos mecanismos. En las vías no lisosomales se incluyen también, además de los proteasomas, otras proteasas como calpaínas, caspasas, etc. cuyo papel en el conjunto de esa degradación es

mucho más limitado. Todos estos sistemas de degradación intracelular de proteínas son esenciales para la homeostasis celular y por ello no resulta sorprendente que se haya puesto claramente de manifiesto en muchos laboratorios que defectos en su funcionamiento tienen un papel relevante en la patogenia de un gran número de enfermedades (Ciechanover & Brundin, 2003; Luciani. *et al.*, 2011; Dennissen *et al.*, 2012). Dentro de estas se encuentran las enfermedades de almacenamiento lisosomal, como veremos a continuación.

1.1. Enfermedades de almacenamiento lisosomal

Los lisosomas son unos orgánulos con un papel muy importante en la degradación de toda clase de macromoléculas, por lo que cuando se producen defectos en su función suele acumularse material diverso sin degradar en su interior (Curcio-Morelli *et al.*, 2010; Settembre *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2005). Esta acumulación da lugar, según cuál sea el material acumulado, a la aparición de diferentes patologías, denominadas en conjunto enfermedades de almacenamiento lisosomal. Estas representan un grupo complejo de trastornos hereditarios, en su inmensa mayoría autosómicos recesivos, que incluye aproximadamente sesenta patologías metabólicas diferentes relacionadas entre sí por la existencia de defectos en genes que producen una alteración en la capacidad de los lisosomas de degradar componentes celulares específicos que, en consecuencia, se acumulan dentro de ellos (Futerman & van Meer, 2004; Schultz *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2009). Entre las proteínas cuya deficiencia causa estas enfermedades y, atendiendo a su función, se incluyen hidrolasas lisosomales (proteasas, lipasas, glucosidasas, sulfatasas, etc.), proteínas activadoras o implicadas en modificaciones postraduccionales necesarias para la hidrólisis lisosomal de ciertas macromoléculas, proteínas integrales de la membrana lisosomal, etc. Todos estos defectos producen, como ya hemos dicho, la acumulación de moléculas sin digerir y de material muy variado en el interior de los lisosomas, que adquieren así una apariencia

característica. Los acúmulos intralisosomales resultan habitualmente en un mal funcionamiento de determinados procesos que implican a estos orgánulos como, por ejemplo, la regulación del pH lisosomal, el tráfico vesicular que ocurre en la autofagia, la endocitosis, la transcitosis y la exocitosis, incluyendo en este último proceso la liberación de neurotransmisores en las sinapsis, la homeostasis del calcio, etc. (Ballabio & Gieselmann, 2009; Bellettato & Scarpa, 2010; Bezprozvanny, 2009; Futerman & van Meer, 2004; Vitner *et al.*, 2010).

Individualmente, la prevalencia de cada una de estas patologías es baja (todas ellas están catalogadas como enfermedades raras) y comprende, de manera muy aproximada, a un afectado por cada 7.000 u 8.000 nacidos vivos en los casos más conocidos. Sin embargo, debido a su carácter hereditario, estas enfermedades son más prevalentes en determinadas poblaciones endogámicas (Ballabio & Gieselmann, 2009; Meikle *et al.*, 1999).

Aproximadamente dos terceras partes de las enfermedades de almacenamiento lisosomal dan lugar a disfunciones en el sistema nervioso central, con un progresivo deterioro cognitivo y motor (Ballabio & Gieselmann, 2009; Bellettato & Scarpa, 2010). A pesar de que los individuos que sufren enfermedades de almacenamiento lisosomal pueden a veces mostrar síntomas tempranos, la mayoría son clínicamente normales en el momento del nacimiento, sugiriendo que la disfunción lisosomal por sí misma no influye de forma significativa en procesos relevantes para el desarrollo primario del cerebro, como lo son la inducción de la placa neural, la diferenciación y migración neuronales y la formación de las sinapsis. Por otro lado, aunque en muchos casos las causas genéticas de estos trastornos están claras, los mecanismos celulares mediante los que las deficiencias en estas proteínas alteran preferentemente la viabilidad neuronal siguen sin conocerse con suficiente precisión.

1.2. Lipofuscinosis ceroides neuronales

Dentro del conjunto de enfermedades de almacenamiento lisosomal, este trabajo se ha centrado en la lipofuscinosis neuronal ceroides (ORPHA216) o NCL, de manera abreviada. Se trata de un conjunto heterogéneo de enfermedades neurodegenerativas hereditarias graves (conocidas con el nombre común de lipofuscinosis ceroides neuronales) que se caracterizan clínicamente por una disminución de la capacidad mental, con epilepsia y pérdida de visión por degeneración retiniana y que, histológicamente, muestran una acumulación intracelular de material autofluorescente. Colectivamente, este grupo de patologías constituye la forma mendeliana más frecuente de enfermedades neurodegenerativas que tienen su inicio en la infancia (Staropoli *et al.*, 2012), ya que afecta a uno de cada 12.500 nacidos vivos en todo el mundo, siendo más prevalente en determinadas regiones (Jalanko & Braulke, 2009; Meikle *et al.*, 1999). Las lipofuscinosis ceroides neuronales están clasificadas dentro del grupo de epilepsias mioclónicas progresivas y son enfermedades autosómicas recesivas, caracterizadas por la presencia del lipopigmento autofluorescente mencionado anteriormente en diversos tejidos de los pacientes, pero especialmente en neuronas del cerebro y en la retina. Las inclusiones lisosomales observadas mediante microscopía electrónica aparecen con una morfología muy variada y que se designa de manera descriptiva con términos tales como osmiofílica granular, curvilínea, en forma de huella dactilar o rectilínea, etc. Esta morfología es distinta en las diferentes variantes de lipofuscinosis ceroides neuronales (Anderson *et al.*, 2013; Goebel, 1996; Haltia & Goebel, 2013; Siintola *et al.*, 2006), por lo que las características ultraestructurales de las inclusiones se han utilizado a veces con propósitos de diagnóstico.

En una primera clasificación, las lipofuscinosis ceroides neuronales se dividieron, según la edad de aparición de sus síntomas, en cuatro grupos principales: infantil (INCL), infantil tardía (LINCL), juvenil (JNCL) y adulta (ANCL). Sin embargo, en los últimos años se han descrito otras variantes de estos tipos, especialmente de la LINCL. Las lipofuscinosis ceroides

neuronales (CLN1-CLN14) son consecuencia de mutaciones en los genes *CLN* (*CLN1-CLN8*, el gen *CLN9* no se ha caracterizado aún, para las nueve primeras variantes de lipofuscinosis ceroides neuronales) o en otros genes (*CTSD* para CLN10, *GRN* para CLN11, *ATP13A2* para CLN12, *CTSF* para CLN13 y *KC7D7* para CLN14). Esos genes codifican proteínas solubles o, sobre todo, de tipo transmembrana (Rakheja *et al.*, 2004; Steenhuis *et al.*, 2012; Vines & Warburton, 1999), localizadas tanto en los endosomas/lisosomas como en el retículo endoplásmico, aunque también se han postulado otras localizaciones, como veremos más adelante. Dentro de las lipofuscinosis ceroides neuronales se han incluido trastornos que dan lugar a patologías similares, como deficiencias en la catepsina D (CLN10), producidas por diversas mutaciones en el gen (*CTSD*) que codifica esa proteasa lisosomal (Fritchie *et al.*, 2009; Siintola *et al.*, 2009). También se han querido incluir en este grupo, aunque esto está mucho más discutido, defectos en varias proteínas de la familia de los canales de cloro (CLC, por sus siglas en inglés) (Poët *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2002), que funcionan como canales de aniones cloruro solamente o como intercambiadores Cl^-/H^+ y que están presentes tanto en la membrana plasmática como en algunas vesículas intracelulares.

La utilización de varios modelos animales (perros, ovejas, etc.) en el estudio de las lipofuscinosis ceroides neuronales ha proporcionado una herramienta de gran valor para poder comprender los mecanismos moleculares que subyacen a estas enfermedades (Cao *et al.*, 2006; Damme *et al.*, 2014; Finn *et al.*, 2011; Galizzi *et al.*, 2011; Kielar *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Kovács *et al.*, 2012; Schmiedt *et al.*, 2012; von Schantz *et al.*, 2009) y además ha hecho posible el descubrimiento de nuevas mutaciones y de nuevos genes candidatos de estas patologías (Ahmed *et al.*, 2010; Tammen *et al.*, 2006).

Los síntomas clínicos de las diferentes lipofuscinosis ceroides neuronales incluyen en las formas infantiles y juveniles (que son la mayoría) atrofia cerebral y retinal (con la consecuente pérdida de visión), epilepsia, retraso

mental progresivo y una reducida esperanza de vida, mientras que en las formas adultas, sobre todo las CLN4A y CLN4B, el síntoma más característico es la demencia (Babacan-Yildiz *et al.*, 2012; Ballabio *et al.*, 2009; Bellettato *et al.*, 2010; Siintola *et al.*, 2006; Sleat *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2013). El cerebro de los pacientes de todas estas enfermedades muestra una elevada pérdida de masa celular neuronal.

Tabla 1. Algunas características de las principales variantes de las lipofuscinoses ceroides neuronales.

Se muestran algunos de los diferentes tipos de lipofuscinoses ceroides neuronales y sus respectivas variantes (CLN1-CLN10), junto con el nombre común del gen cuya mutación ocasiona la enfermedad. Además, se indica el nombre de la proteína codificada por dicho gen cuando se conoce y también su localización subcelular más documentada. No se incluyen otras (ver texto), porque esta clasificación está sometida a continuos cambios. Además, las funciones precisas de la mayoría de esas proteínas son hipotéticas o incluso desconocidas.

ENFERMEDAD	GEN	PRODUCTO DEL GEN	LOCALIZACIÓN
INCL (CLN1)	<i>CLN1</i>	Palmitoil proteína tioesterasa (34 kDa)	Lisosomas
LINCL (CLN2)	<i>CLN2</i>	Tripeptidil peptidasa I (TPP1) (48 kDa)	Lisosomas
JNCL (CLN3)	<i>CLN3</i>	Battenina, proteína transmembrana (55 kDa)	Endosomas/lisosomas
ANCL (CLN4B ¹) v. LINCL y v. finlandesa (CLN5)	<i>CLN4/</i> <i>DNAJC5</i> <i>CLN5</i>	Desconocido	Desconocida
v. LINCL (CLN6/CLN4A ¹)	<i>CLN6</i>	Proteína transmembrana (36 kDa)	Retículo endoplásmico
v. LINCL (CLN7)	<i>CLN7</i>	Proteína transmembrana (~ 100 kDa)	Lisosomas
CLN8 y v. turca NE ² (EPMR ²)	<i>CLN8</i>	Proteína transmembrana (33 kDa)	Retículo endoplásmico /ERGIC ²
v. JNCL (CLN9)	¿?	Desconocido	Desconocida
CLN10	<i>CTSD</i>	Catepsina D (40 kDa)	Lisosomas

¹CLN4A y CLN4B son las formas adultas clásicas (ANCL) de las lipofuscinoses ceroides neuronales. La primera se hereda con una pauta autosómica recesiva y la segunda con una pauta autosómica dominante, lo que supone una excepción de las restantes variantes de lipofuscinoses ceroides neuronales.

²Abreviaturas: EPMR: epilepsia progresiva con retraso mental; ERGIC: compartimento intermedio entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi; NE: síndrome epiléptico del norte; v.: variante.

Actualmente se desconoce aún la función específica de muchas de las proteínas codificadas por los diferentes genes *CLN* implicados. Sin embargo, pese a la heterogeneidad de las proteínas implicadas y a la diversidad, en algunos casos, de su localización subcelular (tabla 1), las similitudes entre los diferentes fenotipos de lipofuscinosis ceroides neuronales sugieren que esas proteínas podrían jugar distintos papeles en una ruta común relacionada con alguna o algunas funciones de los lisosomas y que sería especialmente importante en neuronas (Goebel, 1996; Haltia & Goebel, 2013; Jalanko *et al.*, 2009; Kyttälä *et al.*, 2006).

De entre todas las lipofuscinosis ceroides neuronales, en este estudio nos hemos centrado en dos de ellas por ser las más prevalentes: la LINCL (ORPHA168491) y la JNCL (ORPHA79264), que son consecuencia de mutaciones en los genes *CLN2* y *CLN3*, respectivamente (ver tabla 1), y que, conjuntamente, suponen un 90 % de todos los casos de lipofuscinosis ceroides neuronales diagnosticados en el mundo.

1.2.1. LINCL (CLN2)

La deficiencia en la enzima lisosomal (Lin *et al.*, 2001; Vines & Warburton, 1999) tripeptidil peptidasa 1 (TPP1), codificada por el gen *CLN2*, da lugar a la forma clásica de lipofuscinosis ceroidea neuronal infantil tardía (LINCL) (Rawlings & Barrett, 1999). Esta aminopeptidasa es capaz de eliminar de proteínas pequeñas (de unos 5 kDa) un péptido de tres aminoácidos del extremo amino terminal cuando este no está bloqueado. La TPP1 es producida como una proenzima inactiva de 66 kDa que, a pH ácido, se activa autocatalíticamente a través de un proceso intramolecular por el que se produce la eliminación de su extremo amino terminal, dando lugar así a la forma madura de 48 kDa (Guhaniyogi *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2001). Su glicosilación (N-glicosilación), sobre todo en la asparagina en la posición 286, es particularmente importante y mutaciones en este sitio dan lugar a una enzima poco plegada con una estabilidad y una actividad muy reducidas (Golabek *et al.*, 2003; Wujek *et al.*, 2004). Como es el caso de

otras lipofuscinoses, no se conoce cómo la deficiencia en la TPP1 da lugar a la neurodegeneración selectiva del sistema nervioso central.

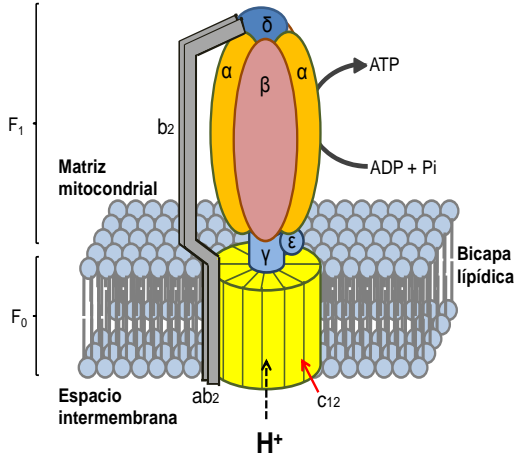


Figura 1. Esquema de la ATP-sintasa mitocondrial. Es un complejo multiproteico formado por dos partes diferenciadas: la F_0 , embebida en la bicapa lipídica de la membrana interna mitocondrial y que sirve de canal de paso a la matriz mitocondrial de los protones acumulados en el espacio intermembrana y la F_1 , dirigida hacia la matriz mitocondrial, encargada de aprovechar el flujo de protones procedente del espacio intermembrana para sintetizar el ATP. La flecha de color rojo señala la situación de las 12 subunidades c de este complejo. Adaptado de Miller *et al.*, 2013.

El componente proteico principal del material acumulado en los lisosomas de pacientes de LINCL, como en la mayoría de las lipofuscinoses ceroides neuronales, es la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial (figura 1). Esta proteína tiene un tamaño de 19 kDa y, por su elevado contenido en aminoácidos apolares, es un proteolípido. La subunidad c se encuentra en el complejo F_0 y es la subunidad transmembrana más importante, formando un anillo oligomérico que constituye el rotor F_0 (Azarashvili *et al.*, 2014). El resto del material acumulado en las LINCL incluye otras proteínas hidrofóbicas minoritarias, ubiquinona, fosfolípidos, lípidos neutros y algunos otros componentes. Aunque los depósitos son mayores en las neuronas del cerebro y en la retina, los fibroblastos procedentes de pacientes de LINCL también los acumulan en gran cantidad. En los fibroblastos procedentes de individuos sanos se ha podido comprobar que la inhibición específica de la TPP1 también da lugar a la acumulación en los lisosomas de la subunidad c, pero no de otras proteínas mitocondriales, por lo que es muy probable que la TPP1 esté implicada en la degradación inicial de esa proteína. Como ya hemos dicho,

la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial también se acumula en las formas más frecuentes de lipofuscinosis ceroides neuronales, incluida la forma congénita CLN10, que es consecuencia de la deficiencia en la catepsina D (Azarashvili *et al.*, 2014; Fritchie *et al.*, 2009; Palmer *et al.*, 2013). Esto quizás permitiría proponer que la degradación de la subunidad c se iniciaría en la TPP1 y que finalizaría en la catepsina D. Además, como el pH óptimo de estas dos proteasas corresponde a valores de pH muy ácidos (en el rango de 3,0 a 5,0, en contraste, por ejemplo, con las catepsinas B o L, que lo tienen alrededor de 6,0), su actividad podría verse reducida cuando aumenta el pH lisosomal, como veremos aquí.

1.2.2. JNCL (CLN3)

Diversas mutaciones en el gen *CLN3* dan lugar a la forma juvenil de las lipofuscinosis ceroides neuronales (JNCL o enfermedad de Batten) (Lerner *et al.*, 1995), la más común de todas estas patologías. La mayoría de los individuos afectados presentan una delección de 1,02 kb, desplazando la pauta de lectura del gen, lo que genera una proteína truncada de 181 aminoácidos en la que los primeros 153 residuos coinciden con la secuencia de la forma silvestre de Cln3p (Pearce *et al.*, 1999; Pearce & Sherman, 1999). Se desconoce la función precisa de la proteína codificada por este gen, a la que se llama a veces battenina. Se trata de una proteína transmembrana de 438 aminoácidos (figura 2) que se postula que está asociada especialmente a las balsas lipídicas o *lipid rafts* (microdominios de membrana enriquecidos en esfingolípidos y en colesterol), particularmente a las que se localizarían en el sistema endosomal/lisosomal (Golabek *et al.*, 2000; Kida *et al.*, 1999; Rakheja *et al.*, 2004; Uusi-Rauva *et al.*, 2012). Paralelamente, otros grupos han descrito una asociación de la battenina al complejo de Golgi, a proteínas del citoesqueleto o incluso también a mitocondrias (Katz *et al.*, 1997; Kremmidiotis *et al.*, 1999; Uusi-Rauva *et al.*, 2008). Aunque la localización mitocondrial resulta controvertida, sí que es cierto que algunos datos parecen apoyar una relación de Cln3p con la mitocondria, como la presencia de una posible secuencia de localización

mitocondrial en la proteína, el que se hayan observado en células de pacientes de JNCL cambios en la morfología mitocondrial, la acumulación mayoritaria de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial, una reducción de los niveles de ATP y una menor tolerancia al estrés oxidativo (Fossale *et al.*, 2004; Janes *et al.*, 1996; Jolly *et al.*, 2002). Nuestros propios datos (Villarroya, tesis doctoral, 2002) apoyan una localización principal de Cln3p en la membrana lisosomal, y las observaciones anteriores podrían explicarse perfectamente por la participación de los lisosomas en el recambio mitocondrial a través de la macroautofagia.

Varios estudios en *Saccharomyces cerevisiae* permitieron identificar al gen *BTN1*, que era homólogo del gen humano *CLN3* (Chattopadhyay *et al.*, 2000; Pearce *et al.*, 1999). La identidad entre ambos genes es del 39 % y la proteína codificada, que se encuentra localizada en la vacuola de la levadura, es similar en un 59 % a Cln3p, y presenta un perfil de hidrofobicidad parecido. Mutaciones en *BTN1* demostraron que no es un gen esencial y que no afecta ni al crecimiento, ni a la viabilidad celular (Pearce *et al.*, 1999). En este organismo tampoco parece que la proteína juegue un papel directo en la degradación de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial (Kim *et al.*, 2005), por lo que algunos autores ponen en duda la utilidad de este modelo para estudiar la forma juvenil de las lipofuscinosis ceroides neuronales.

Existen al menos seis formas de la proteína Cln3p que son consecuencia de *splicing* alternativo, pero su función biológica se desconoce (Cotman *et al.*, 2002). Algunos autores las han relacionado con el mantenimiento del pH vacuolar, al observarse una menor acidificación de los lisosomas en fibroblastos tratados con ADNc antisentido (Golabek *et al.*, 2000). La proteína Cln3p posee 6 dominios transmembrana que le confieren un carácter hidrofóbico y, además, en la cara luminal de la membrana posee una hélice anfipática, es decir, formada por residuos polares y residuos hidrofóbicos que se sitúan en la misma posición de la hélice. Esta hélice, aunque próxima al extremo C-terminal, contiene la secuencia mencionada

antes que es similar a la de un péptido señal que dirige las proteínas de nueva síntesis hacia la mitocondria (Nugent *et al.*, 2008).

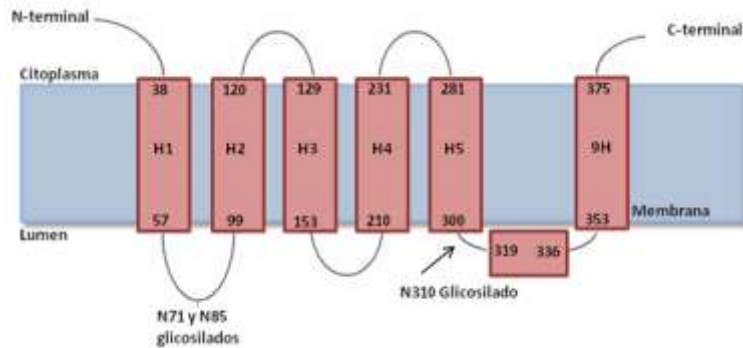


Figura 2. Modelo esquemático de la proteína Cln3p humana. En el esquema se muestran las seis hélices transmembrana y la hélice anfipática situada en el lumen (correspondiente a los aminoácidos 319 a 336), así como las localizaciones de los lazos. Las mutaciones implicadas en la enfermedad están localizadas mayoritariamente en las hélices transmembrana o adyacentes a ellas, en los lazos evolutivamente conservados en el lumen o en la hélice anfipática. Adaptado de Nugent *et al.*, 2008.

La proteína Cln3p no comparte homología con ninguna proteína conocida, pero debido a su estructura (ver figura 2) podría desempeñar una función de transporte, actuando como algún tipo de canal (Kim *et al.*, 2003; Ramírez-Montealegre & Pearce, 2005). Además, la proteína Cln3p podría tener también un papel indirecto en el tráfico de membranas, regulando la fusión de vesículas que depende del pH intravesicular. Esto es coherente con su localización en el sistema endosomal/lisosomal en diversos tipos celulares, neuronales y no neuronales (Kyttälä *et al.*, 2004; Luiro *et al.*, 2004; Persaund-Sawin *et al.*, 2004; Uusi-Rauva *et al.*, 2008; Villarroya, tesis doctoral, 2002). Por otro lado, la sobreexpresión de Cln3p acelera el crecimiento celular y protege a las células de la apoptosis (Proud, 2002) y, de hecho, se ha visto que los niveles de esta proteína aumentan en diversos tipos de cáncer (Rylova *et al.*, 2002; Tardy *et al.*, 2006). En cualquier caso y a pesar de todas esas sugerencias, la función exacta de Cln3p sigue siendo desconocida actualmente.

En resumen, la presencia de mutaciones en las proteínas TPP1 y Cln3p da lugar a la acumulación de material no degradado en el interior de los lisosomas de los pacientes en la LINCL y JNCL, respectivamente, que contienen especialmente en ambos casos a la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial. Puesto que, como comentábamos al principio, una de las funciones más importantes del sistema endosomal/lisosomal es la degradación intracelular de proteínas y este es un proceso esencial para la supervivencia de las células, en este trabajo hemos considerado la posibilidad de que esa acumulación pudiera afectar a ese proceso, cuyas características principales resumimos a continuación.

1.3. Vías de degradación intracelular de proteínas

La degradación intracelular de proteínas es llevada a cabo por unas enzimas, llamadas genéricamente proteasas o peptidasas, que, actuando coordinadamente, se encargan de hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas hasta sus aminoácidos constituyentes (Ciechanover, 2012; Dean, 1980; Kaminsky & Zhivotovsky, 2004; Suraweera *et al.*, 2012). En el ser humano se han descrito más de 500 proteasas (López-Otín & Bond, 2008), que corresponden a una de las clases de enzimas más abundantes del genoma humano. Aunque varias de esas proteasas son extracelulares, existen también proteasas intracelulares que están localizadas prácticamente en todos los subcompartimentos de la célula. Sin embargo, y como ya se ha comentado al principio de esta Introducción, tradicionalmente las vías proteolíticas intracelulares, que dependen de esas proteasas, se han dividido en dos grandes apartados: las vías no lisosomales y las vías lisosomales de degradación intracelular de proteínas (Dean, 1980; Knecht *et al.* 2009).

1.3.1. Vías no lisosomales

Las vías no lisosomales de degradación intracelular de proteínas participan, aunque no de modo exclusivo, en la degradación de proteínas defectuosas, incluidas las proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, y también de proteínas reguladoras de gran importancia y de vida media muy corta (Eisele & Wolf, 2008; Fuertes *et al.*, 2003a; Suraweera *et al.*, 2012). Así, por ejemplo, a través sobre todo de estas vías se degradan las ciclinas, que controlan la progresión del ciclo de división celular en diversos puntos, diferentes factores de transcripción, proteínas reguladoras que catalizan pasos limitantes en rutas metabólicas, etc.

El papel principal en la degradación intracelular de proteínas por las vías no lisosomales lo llevan a cabo los diferentes proteasomas, cuya localización es tanto citosólica como nuclear. Estos complejos supramoleculares degradan principalmente proteínas marcadas mediante cadenas de poliubiquitina con una determinada topología (Bader *et al.*, 2007; Brooks *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 1996; Rivett, 1993).

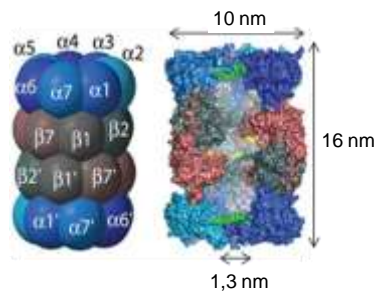


Figura 3. Estructura del proteasoma 20S. El proteasoma 20S completo tiene un tamaño de 16 nm de alto por 10 nm de ancho, con una entrada a cada lado de 1,3 nm, que indica que las proteínas deben estar, al menos parcialmente, desplegadas para acceder al interior. Allí, hay un hueco catalítico con un diámetro máximo de 5,3 nm. Los anillos β se disponen en el centro de la estructura, exponiendo hacia dentro del anillo los residuos de treonina del extremo N-terminal (puntos amarillos), capaces de catalizar la hidrólisis del enlace peptídico. Adaptado de Rechsteiner & Hill, 2005.

Los proteasomas (Coux *et al.*, 1996; Tanaka *et al.*, 2012) son complejos proteolíticos que existen en diferentes asociaciones poliméricas. La unidad fundamental es una estructura cilíndrica hueca, el proteasoma 20S (~700 kDa), que solamente es capaz de degradar sustratos desplegados, lo que excluye como sustratos a las proteínas plegadas con estructura nativa. El proteasoma 20S eucariótico está formado por cuatro anillos heptaméricos (figura 3). Los dos exteriores son idénticos y están formados, cada uno, por

siete subunidades α distintas ($\alpha 1$ - $\alpha 7$), todas de expresión constitutiva. Los dos anillos internos son también idénticos entre sí y constan, cada uno también, de siete subunidades β distintas ($\beta 1$ - $\beta 7$), de expresión constitutiva, aunque existen tres más ($\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$) de expresión inducible.

En células de mamífero, tres de las subunidades β (concretamente β_1 , β_2 y β_5) contienen los tres sitios de actividad proteolítica del proteasoma y forman lo que se denomina su núcleo catalítico. En cambio, las subunidades α carecen de actividad proteolítica y han evolucionado a partir de las β . Cada una de estas subunidades β ha desarrollado una actividad proteolítica distinta (Orlowski & Wilk, 2000). Estas se han clasificado como actividad peptidil-glutamil hidrolizante, también llamada actividad similar a caspasa (β_1), actividad similar a tripsina (β_2) y actividad similar a quimotripsina (β_5), siendo esta última la que parece más importante en la degradación intracelular de proteínas por proteasomas (Kisselev & Goldberg, 2005). Además, y como ya hemos mencionado, en los mamíferos existen tres genes más que codifican variantes de las subunidades de tipo β y cuya expresión es inducible. Esto ocurre, por ejemplo, cuando aumenta la respuesta inmune o por el tratamiento con el interferón γ . La incorporación de forma cooperativa de estas subunidades inducibles produce una sustitución de las subunidades β_1 , β_2 y β_5 constitutivas, que son desplazadas por las inducibles, dando lugar a la formación de un subtipo de proteasoma: el inmunoproteasoma. Este es, al parecer, el responsable de la generación de péptidos antigénicos que posteriormente presentará el complejo principal de histocompatibilidad de clase I.

La estructura en barril del proteasoma permite la existencia de una cámara catalítica de unos 84 nm^3 formada por los anillos β y de dos antecámaras de unos 59 nm^3 formadas cada una por un anillo α y uno β , y que permiten que el proteasoma 20S pueda alojar una cantidad considerable de productos de degradación de los sustratos proteicos (Jung & Grune, 2013). Además, solamente se puede llegar a los centros activos de la cámara catalítica mediante dos poros axiales. En ellos se encuentra el grupo hidroxilo de la

treonina que permite el ataque nucleofílico y que se sitúa en el extremo amino terminal de estas tres subunidades β . Esta treonina caracteriza a los proteasomas como miembros de una nueva familia de hidrolasas con un único residuo activo nucleofílico amino-terminal, pudiendo ser este una treonina, una serina o una cisteína (Oinonen & Rouvinen, 2000).

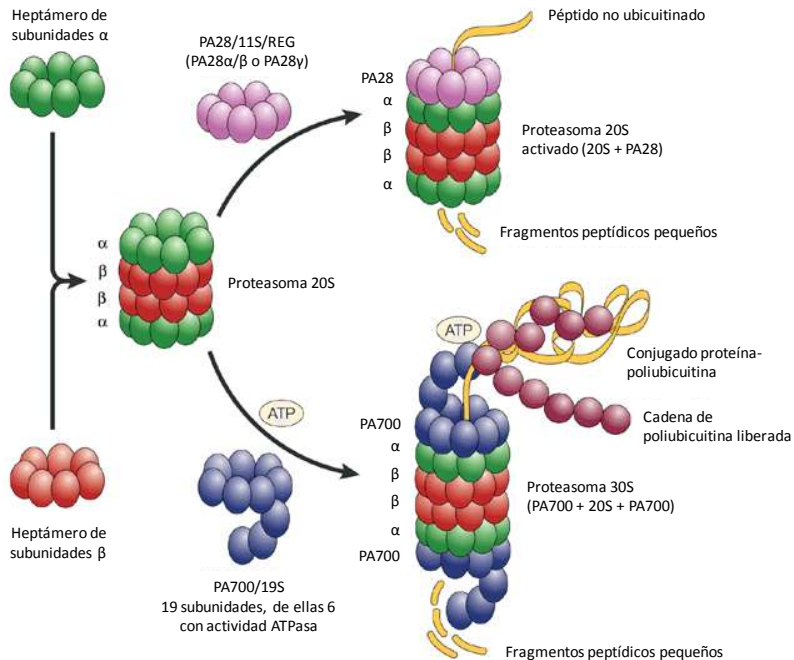


Figura 4. Estructura y mecanismo de acción del proteasoma 30S y del proteasoma-PA28.

El proteasoma 30S funcional está formado por la unión de un proteasoma 20S, que contiene el núcleo catalítico, constituido por dos heptámeros de subunidades α y dos de subunidades β , y por dos complejos reguladores 19S, formados a su vez por dos complejos proteicos: una tapa y una base. Este proteasoma 30S reconoce proteínas poliubiquitinadas a través de una de las subunidades más externas de las partículas reguladoras 19S y, gracias a la hidrólisis del ATP, se produce la desubiquitinación de la proteína, su desplegamiento y su transporte a través de una apertura entre las subunidades del complejo al proteasoma 20S para su degradación. El proteasoma-PA28 reconoce proteínas no poliubiquitinadas y las introduce dentro del proteasoma 20S hasta alcanzar las subunidades catalíticas β que intervienen en su degradación. Adaptado de McNaught *et al.*, 2001.

El proteasoma 20S puede asociarse con otros complejos reguladores y activadores a través de sus anillos α . Por ejemplo, puede hacerlo con un activador independiente de ATP denominado complejo regulador 11S, cuya

expresión también aumenta en las mismas situaciones en que lo hacen las subunidades inducibles del inmunoproteasoma, por lo que se supone que debe tener un papel similar a este (ver arriba). El complejo regulador 11S (REG o PA28) posee una estructura heptagonal y está formado por dos tipos de subunidades, PA28 α y PA28 β . Es capaz de unirse por cualquiera de los dos extremos, o por ambos, tanto al proteasoma 20S como al inmunoproteasoma para formar complejos proteasoma-PA28. De este modo, es muy probable que el complejo proteasoma-PA28 que contiene al inmunoproteasoma con las subunidades β de expresión inducible sea el principal responsable de la generación de los péptidos antigénicos mencionada anteriormente (Pickart & Cohen, 2004; Wang & Maldonado, 2006). El proteasoma 20S también puede asociarse con el complejo regulador 19S o PA700 (figura 4), generándose el proteasoma 26S de aproximadamente 1,6 MDa (Coux *et al.*, 1996) cuando solo se une un complejo regulador, o el proteasoma 30S de aproximadamente 2,5 MDa si se unen dos, uno por cada extremo del proteasoma 20S. Mientras que el proteasoma 20S degrada selectivamente diversas proteínas oxidadas, de manera independiente de ATP y de ubiquitina (Eisele & Wolf, 2008; Orłowski & Wilk, 2003), el proteasoma 26S requiere ATP para su activación y se le considera el más importante para la degradación intracelular, tanto de proteínas poliubiquitinadas (figura 4) como de algunas no ubiquitinadas (Coux *et al.*, 1996). Estos proteasomas son capaces de hidrolizar de forma más eficaz aquellos enlaces peptídicos situados detrás de residuos hidrofóbicos o básicos y, con menor eficiencia, aquellos situados detrás de residuos ácidos. Los complejos reguladores 11S y 19S pueden también unirse a la vez al proteasoma 20S, cada uno por un extremo, generando un proteasoma mixto o híbrido PA28-20S-PA700 cuya función se desconoce (Coux *et al.*, 1996). También existen otros complejos reguladores del proteasoma sobre los que se sabe mucho menos, como el PA28 γ , el PA200 y el inhibidor PI31. Además, todos ellos pueden formar proteasomas híbridos al unirse a cada uno de los dos extremos complejos diferentes, lo

que da una idea de la gran diversidad de combinaciones posibles y de la gran variedad de funciones que podrían desempeñar.

En la degradación de proteínas por parte de los proteasomas 26S y 30S participa muchas veces la ubiquitina. Se trata de una proteína globular de 76 aminoácidos y 8,5 kDa, que está presente de manera muy conservada evolutivamente en diversos organismos desde levaduras hasta mamíferos. La ubiquitina se une covalentemente a través de su extremo carboxilo a las proteínas que van a ser degradadas, generalmente a través del grupo ϵ -amino de sus lisinas, pudiendo formar una larga cadena de poliubiquitinas al unirse más ubiquitinas a una lisina de la ubiquitina anterior (Hartmann-Petersen *et al.*, 2003; Hershko *et al.*, 2000; Mani & Gelmann, 2005; Miller & Gordon, 2005; Pickart & Cohen, 2004).

La ubiquitinación de proteínas tiene lugar gracias a la hidrólisis del ATP, mediante una reacción en serie en la que intervienen tres tipos de enzimas, E1, E2 y E3 (Hershko & Ciechanover, 1998; Mattern *et al.*, 2012). La reacción de ubiquitinación se inicia con la adenilación del extremo carboxilo de la glicina 76 y la formación de un enlace tioéster de esta glicina con la cisteína del centro activo de la enzima E1 (enzima activadora de ubiquitina). A continuación, la ubiquitina activada se transfiere a la cisteína del centro activo de la enzima E2 (enzima conjugadora de ubiquitina) y una E3 (ubiquitina ligasa) cataliza la transferencia de la ubiquitina hasta el sustrato. La especificidad de la reacción viene marcada por las numerosas enzimas E3 que reconocen de manera específica los sustratos donde unen la ubiquitina y también por las combinaciones que se establecen con las enzimas E2, que son bastante menos abundantes que las E3. Como ya se ha dicho arriba, este ciclo puede repetirse varias veces al añadirse otra ubiquitina a un ϵ -amino de alguna de las siete lisinas de la ubiquitina anterior, dando así lugar a las cadenas de poliubiquitina (Min & Lindon, 2012). Además, la topología de este marcaje con ubiquitina es importante para dirigir las proteínas hacia diferentes vías de degradación. Así, en el caso de proteínas destinadas a

degradación por proteasomas esta unión se produce generalmente a través de la lisina 48 de la ubiquitina. Otro ejemplo lo proporciona la ubiquitinación a través de la lisina 29 o de la lisina 63, que pueden dirigir los sustratos para que sean degradados mayoritariamente por proteasomas o por lisosomas, respectivamente, aunque la ubiquitinación a través de la lisina 63 también se ha visto asociada a la participación de los sustratos en la transducción de señales, en el tráfico de proteínas o en la reparación del ADN entre otras funciones (Wong & Cuervo, 2010). En cualquier caso, existe una gran variedad de posibilidades de poliubiquitinación según cuál sea la lisina de la ubiquitina que interviene en la cadena, existiendo también casos en los que se han descrito cadenas de poliubiquitina mixtas que se forman con lisinas en posiciones diferentes en las ubiquitinas de una misma cadena. Hay que mencionar también que un nivel adicional de complejidad en estos procesos lo proporcionan la monoubiquitinación, la ubiquitinación N-terminal y la desubiquitinación por enzimas específicas, que es el paso previo a la degradación de la proteína o a su recuperación funcional, pero en cuyos detalles no podemos entrar aquí.

Además de la vía ubiquitina-proteasomas, dentro de las vías no lisosomales de degradación intracelular de proteínas se incluyen también las que implican a otras proteasas como las calpaínas, que están reguladas por los niveles celulares de Ca^{+2} , las caspasas, que intervienen en la apoptosis, y otras proteasas localizadas en el interior de diversos orgánulos (Bulteau & Bayot, 2011; Garg *et al.*, 2011; Jeyaraju *et al.*, 2013; Shanab *et al.*, 2012) como mitocondrias y retículo endoplásmico. Sin embargo, la aportación de todas esas proteasas al conjunto de la degradación intracelular de proteínas es solo minoritaria.

1.3.2. Vías lisosomales

Los lisosomas son unos orgánulos citoplásmicos muy heterogéneos, presentes de forma ubicua en las células eucariotas. Están delimitados por una membrana que contiene varias proteínas transmembrana, muchas de ellas de función aún desconocida. Los lisosomas encierran en su interior, que se mantiene a un pH de 4,5 a 5,0 aproximadamente mediante una bomba de protones localizada en su membrana, a numerosas enzimas hidrolíticas cuyo pH óptimo de actuación es ácido (Saftig *et al.*, 2010). Una gran variedad de procesos celulares dependen de una adecuada función lisosomal, como es el caso del recambio de los componentes celulares, la homeostasis del colesterol, la regulación negativa de los receptores de la superficie celular, la inactivación de patógenos, la reparación de la membrana plasmática y la remodelación ósea, por citar solo unos pocos ejemplos.

Los lisosomas están implicados en la degradación, para dar lugar a sus componentes básicos, de una gran variedad de moléculas con una estructura muy diversa, tales como proteínas, glucosaminoglicanos, esfingolípidos y otros lípidos complejos, ácidos nucleicos, oligosacáridos y polisacáridos, etc. Estos componentes pueden reciclarse a través de rutas biosintéticas o, algunos de ellos, degradarse para obtener energía. Las vías lisosomales de degradación intracelular de proteínas son responsables tanto de la degradación de proteínas extracelulares que entran a la célula por las diferentes formas de endocitosis, como también de la degradación de proteínas intracelulares que se incorporan a estos orgánulos través de las diferentes formas de autofagia. La endocitosis, que como hemos dicho incluye varias vías, implica, de una forma muy simplificada (ver más adelante), la maduración de endosomas tempranos para formar finalmente endosomas tardíos que se fusionarán con los lisosomas (Saftig & Klumperman, 2009). Además, en los endosomas tempranos las proteínas internalizadas, solubles y de membrana, pasan por un subcompartimento conocido como endosoma de clasificación (*sorting endosome*), desde el que pueden reciclarse algunas proteínas de membrana y volver a la membrana

plasmática o avanzar el resto hacia su degradación en endosomas tardíos y lisosomas. En cuanto a la autofagia, se incluyen aquí varios mecanismos como la crinofagia (que se refiere a la degradación del exceso de proteínas de secreción en células secretoras) y las tres autofagias más conocidas: la macroautofagia, la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas (figura 5) (Lozy & Karantza, 2012; Meijer & Codogno, 2004). De hecho, en determinadas condiciones, la endocitosis que se dirige a lisosomas (a la que se llama también heterofagia cuando se incluye dentro de las vías lisosomales de degradación intracelular de proteínas, ya que junto a material extracelular también puede degradar proteínas de la membrana celular) y la macroautofagia son las principales vías de degradación intracelular de proteínas que operan en la mayoría de las células eucariotas (Reggiori & Klionsky, 2002).

1.3.2.1. Mecanismos lisosomales de degradación intracelular de proteínas

MACROAUTOFAGIA

La vía lisosomal de degradación intracelular de proteínas más conocida se ha denominado autofagia (clásica) o macroautofagia y es especialmente activa durante el ayuno. La macroautofagia se inicia con la formación de una estructura membranosa, el fagóforo, que se cierra para formar un autofagosoma limitado por dos o más membranas y que secuestra porciones más o menos grandes de citoplasma, incluyendo orgánulos enteros como mitocondrias o los propios lisosomas. Este paso inicial es el que se ha considerado como la principal diana en la regulación fisiológica de este proceso por factores nutricionales y hormonales (Klionsky, 2004; Meijer & Codogno, 2004). Una vez formado, el autofagosoma se fusiona con un endosoma secundario y/o con un lisosoma, formando un autolisosoma (que finalmente posee una sola membrana al degradarse la más interna por las enzimas lisosomales). En este orgánulo es donde ocurre a pH ácido la

completa digestión de los componentes (orgánulos y macromoléculas) secuestrados (Cuervo, 2004; Klionsky, 2005).

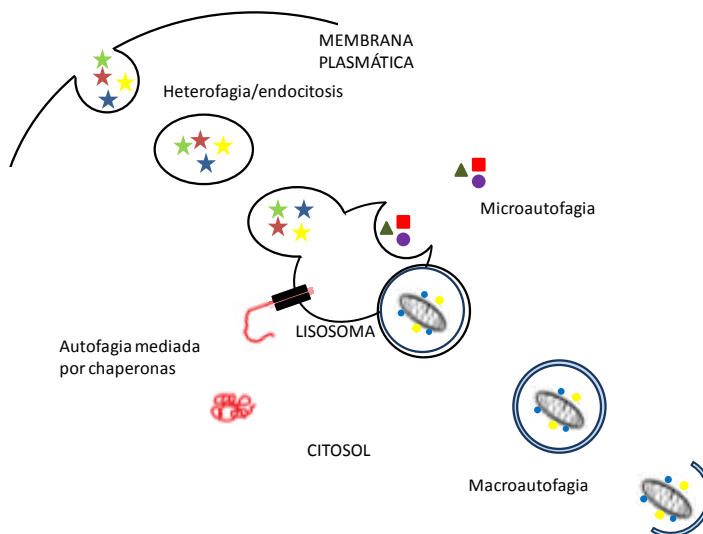


Figura 5. Principales mecanismos de proteólisis lisosomal. En la mayoría de células, las proteínas se incorporan a los lisosomas para su degradación principalmente mediante macroautofagia, heterofagia (endocitosis), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. Ver texto para una explicación más detallada.

Los autofagosomas y los autolisosomas se denominan también vacuolas autofágicas, ya que no siempre es fácil distinguirlos con criterios exclusivamente morfológicos. Se han identificado vacuolas autofágicas en la casi totalidad de los tipos celulares examinados, sobre todo en condiciones de ayuno. De hecho, como ya se ha dicho, los procesos macroautofágicos se consideran responsables de la mayoría de la degradación de las proteínas y de los componentes celulares que ocurre en esas condiciones (Fuertes *et al.*, 2003b; Klionsky, 2004). Pero la macroautofagia también puede desempeñar un papel muy importante en muchos otros procesos, como durante el desarrollo, la supresión tumoral, la resistencia a los patógenos y en el envejecimiento al proteger a la célula frente al estrés oxidativo (Esteve *et al.*, 2010; Esteve & Knecht, 2011; Gozuacik & Kimchi, 2004; Levine & Klionsky, 2004; Nakagawa *et al.*, 2004; Vellai *et al.*, 2003). También se sabe que la macroautofagia está implicada de diversas formas

en numerosas enfermedades humanas, como cáncer, diabetes, cardiomiopatías, esteatosis hepática y trastornos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer, la de Parkinson o la de Lafora (Czaja, 2011; Dong & Czaja, 2011; Ebato *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2008; Knecht *et al.*, 2010; Knecht *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2003; Tanaka *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2003), por citar tan solo algunos ejemplos.

Puesto que a través de la macroautofagia se degradan lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y glúcidos, cuando ocurren alteraciones en este proceso puede producirse la acumulación en la célula de algún tipo de macromolécula sin degradar. Por ejemplo, la deficiencia en *N*-acetilglucosamino-1-fosfotransferasa produce la acumulación masiva de lípidos y mucopolisacáridos no digeridos en los lisosomas, lo que da lugar a las mucopolisacáridosis II y III (Cury *et al.*, 2013). Otro ejemplo más entre otros muchos lo proporciona la deficiencia en la proteína lisosomal LAMP-2, que da lugar a una miopatía, la enfermedad de Danon, en la que se produce la acumulación de glucógeno y productos de degradación citosólica en los lisosomas de los pacientes (Eskelinen *et al.*, 2004; Knecht *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2000).

La macroautofagia está muy conservada evolutivamente, desde levaduras hasta humanos (Cheng *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2010; Kanazawa *et al.*, 2003; Reggiori & Klionsky, 2002; Tokunaga *et al.*, 2004). A causa de esto, muchos de los genes humanos implicados en las diferentes etapas de la macroautofagia (formación del autofagosoma, fusión con los lisosomas, etc.) tienen sus correspondientes homólogos en levaduras, donde se descubrieron y estudiaron inicialmente. Estos genes son los llamados *ATG*, de los que actualmente se conocen más de treinta (Boya *et al.*, 2013; Klionsky, 2005). Clásicamente se ha considerado a la macroautofagia como una vía de degradación no selectiva aunque, en algunas situaciones, determinados orgánulos y componentes celulares son degradados selectivamente, probablemente por encontrarse en exceso, por estar dañados o por no ser ya necesarios (Cuervo, 2004). En este sentido, se han

descrito tipos selectivos de macroautofagia (como la pexofagia, la mitofagia, la ribofagia, etc.) que utilizan proteínas receptoras y adaptadoras para aislar de forma específica un material que será degradado (Lynch-Day & Klionsky, 2010).

CRINOFAGIA

La crinofagia (Glaumann, 1989), como ya se ha mencionado, degrada proteínas de secreción cuando disminuye su demanda, mediante un proceso de fusión de las vesículas secretoras con endosomas tardíos y/o con lisosomas, en lugar de con la membrana plasmática, permitiendo a las células adaptarse así a las variaciones en los requerimientos metabólicos. Se trata de un tipo de autofagia no muy extendido.

MICROAUTOFAGIA

En la microautofagia (Kunz *et al.*, 2004) se internalizan pequeñas porciones del citoplasma en el lumen lisosomal gracias a diferentes modificaciones (túbulos, vesículas, etc.) de la membrana de estos orgánulos, produciendo vesículas intralisosomales que, tras desintegrarse su membrana, permiten que el contenido de las mismas sea degradado por las proteasas lisosomales. No se conoce todavía si este proceso, que parece que actúa sobre todo en condiciones basales, es o no selectivo (Klionsky, 2004).

AUTOFAGIA MEDIADA POR CHAPERONAS

En la autofagia mediada por chaperonas (Agarraberes & Dice, 2001; Bejarano & Cuervo, 2010; Cuervo, 2011; Dice, 2007; Kiffin *et al.*, 2004; Orenstein & Cuervo, 2010; Salvador *et al.*, 2000) las proteínas atraviesan directamente la membrana lisosomal desde el citosol hasta el lumen del lisosoma. Esto ocurriría de la misma manera en que muchas proteínas pueden atravesar las membranas de otros orgánulos celulares (mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, retículo endoplásmico), tanto de forma cotraduccional como postraduccional, para alcanzar su localización intracelular adecuada. El transporte por esta vía de proteínas sustrato (que

contienen alguna secuencia análoga a la KFERQ) ocurre a través de la membrana lisosomal y requiere, al menos, ATP/Mg²⁺, el miembro de la familia de proteínas de choque térmico de 70 kDa (hsp70) que se expresa constitutivamente en el citosol (hsc70 o proteína de choque térmico constitutiva de 70 kDa), una variante de esa hsc70 que se encuentra en el interior del lisosoma y otras chaperonas en la membrana e incluso lumen de este orgánulo, así como también un receptor en la membrana del lisosoma (LAMP-2A).

ENDOCITOSIS

La heterofagia o endocitosis (Doherty & McMahon, 2009) es el nombre genérico con que se conoce un número variado de vías de internalización de moléculas extracelulares o de la membrana plasmática para su degradación en los lisosomas hasta sus monómeros constituyentes. Pero la endocitosis es mucho más que un conjunto de mecanismos para incorporar moléculas externas a la célula, ya que juega un papel clave en procesos tan dispares como la regulación de muchas cascadas de señalización intracelular, la mitosis, la presentación de antígenos y la migración celular, entre otros. Además, permite junto con la exocitosis, la transcitosis y el reciclaje, que la célula interactúe con su entorno, eliminando o reincorporando a la membrana los receptores que le permitirán responder a las señales derivadas de la unión de sus respectivos ligandos (Burgdorf & Kurts, 2008; Carvou *et al.*, 2007; Panicker *et al.*, 2006).

Clásicamente, se distinguían, aparte de la fagocitosis, dos vías generales principales en la entrada a la célula de este material extracelular: la endocitosis de fase fluida y la endocitosis mediada por receptor. Sin embargo, estos términos se han quedado obsoletos y en la literatura se suelen clasificar en dos vías principales: la endocitosis mediada por clatrina y la endocitosis independiente de esta proteína (Lundmark & Carlsson, 2010), cuyas vías principales son la fagocitosis, la macropinocitosis y la endocitosis mediada por caveolas (figura 6), aunque existen también otras menos conocidas como las dependientes de flotilina, de Arf6 y las que implican a túbulos generados por

CLIC/GEEC (Bohdanowicz & Grinstein, 2013). Aunque en varios tipos celulares, como fibroblastos, parece que ambas formas de endocitosis, mediada y no mediada por clatrina, son igual de importantes, su contribución relativa puede variar en la mayoría de células por adaptación a funciones específicas.

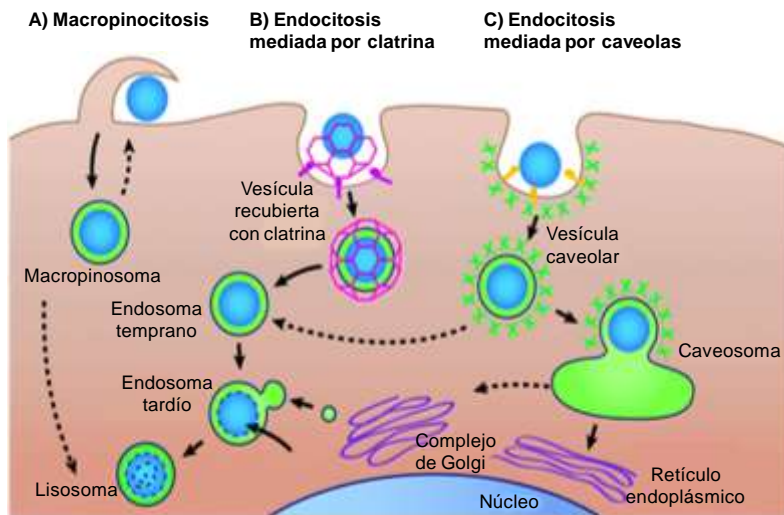


Figura 6. Esquema general algunas vías endocíticas distintas a la fagocitosis. En la imagen se muestran tres de las principales vías, así como el tráfico vesicular implicado: la clásica endocitosis mediada por clatrina en el centro y dos vías independientes de clatrina (macropinocitosis y endocitosis mediada por caveolas, a los lados). Adaptado de Gerber *et al.*, 2013.

En la **endocitosis mediada por clatrina** se forman en la membrana plasmática vesículas endocíticas recubiertas por esta proteína y también por adaptinas y otras proteínas. Esto da lugar a endosomas tempranos en los que, debido a la acción de una bomba de protones localizada en su membrana, se produce un descenso progresivo del pH endosomal. Esto implica un cambio de conformación de los receptores internalizados por esta vía que se disocian así del ligando (Ferreira *et al.*, 2012). Muchos receptores, como el de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y el de la transferrina, se reciclan de vuelta a la superficie de la célula, mientras que los ligandos y el resto de proteínas de membrana plasmática pasan a formar parte de los llamados endosomas tardíos con un pH ácido aún más bajo.

Estos, finalmente, se fusionan con lisosomas primarios, que son aquellos que no han intervenido aún en procesos degradativos y que presentan toda su dotación enzimática, o lo hacen con lisosomas secundarios, que son lisosomas que además contienen ya sustratos que van a degradarse (Lundmark & Carlsson, 2010).

Por otro lado, la endocitosis independiente de clatrina se ha dividido, como hemos mencionado ya, en una gran variedad de vías (Mayor & Pagano, 2007). Una de ellas es la **endocitosis mediada por caveolas**. Las caveolas pueden considerarse un subconjunto de los *lipid rafts*, que son bastante abundantes en fibroblastos, adipocitos y células musculares y endoteliales, pero que, sin embargo, no se han observado, al menos claramente, en neuronas (Doherty & McMahon, 2009). Su principal característica es la presencia de la caveolina-1, una proteína de membrana necesaria para la biogénesis de las caveolas. Debido a esta proteína, las caveolas poseen su estructura característica en forma de botella, de unos 60-80 nm, y pueden internalizar moléculas que se unen a la superficie de las caveolas. Estas moléculas contenidas en las caveolas son transportadas hasta los caveosomas, que son endosomas que contienen caveolina-1 (Pelkmans & Helenius, 2002). Además de la caveolina-1, que está presente en la mayor parte de los tipos celulares, existen otras isoformas, como la caveolina-2, o la caveolina-3 que es específica de las células musculares (Doherty & McMahon, 2009). En las caveolas también se encuentran otras proteínas, como la cavina, que induce la curvatura de la membrana, o la dinamina, que, como en varios otros tipos de endocitosis, permite la escisión de las vesículas, así como otras proteínas que median la posterior fusión de la vesícula que se ha formado (como la proteína VAMP2 o la SNAP) (Nabi, 2009; Schnitzer *et al.*, 1995). La endocitosis mediada por caveolas es relativamente lenta (comparada, por ejemplo, con la endocitosis mediada por clatrina) y es capaz de eludir a los lisosomas, por lo que ciertos patógenos, incluidos virus o incluso algunas bacterias, se aprovechan de ella para evitar ser degradadas (Carver & Schnitzer, 2003; Gilbert *et al.*, 1999). Normalmente,

las moléculas que se internalizan a través de esta vía interactúan con los glucoesfingolípidos que se encuentran en las caveolas, como GM-1 al que se une la toxina B del cólera o la globotriaosilceramida Gb3 a la que se une la toxina Shiga. Por eso, estas toxinas se han usado a veces como marcadores de esta vía endocítica (Doherty & McMahon, 2009), aunque debe tenerse en cuenta que también pueden ser internalizadas a través de otras endocitosis dependientes o no de clatrina. Además, las caveolas son capaces de internalizar una gran variedad de ligandos, incluidos lípidos, ácidos grasos y proteínas de membrana (Carver & Schnitzer, 2003).

Otra forma de endocitosis de fase fluida independiente de clatrina es la **macropinocitosis**, un proceso que depende de actina y colesterol (Falcone *et al.*, 2006; Grimmer *et al.*, 2002). Esta vía endocítica constituye un caso especial de endocitosis independiente de clatrina, caveolas y dinamina (Grimmer *et al.*, 2002; Mercer & Helenius, 2009). Se inicia mediante la activación transitoria de los receptores tirosina quinasa por parte de factores de crecimiento. La activación del receptor da lugar a una cascada de señalización que conduce a cambios en el citoesqueleto de actina y a la posterior formación de ondulaciones en la membrana celular, que sobresalen de la célula para envolver porciones del medio extracelular junto con los nutrientes que este contiene (Jones, 2007; Kerr & Teasdale, 2009; Mercer & Helenius, 2009). Durante la endocitosis del material capturado se forma una vacuola intracelular denominada macropinosoma (Swanson, 2008), cuyo tamaño oscila entre las 0,5 y 10 micras. Asimismo, muchas partículas, como las bacterias, cuerpos apoptóticos, células necróticas o virus, pueden inducir la formación de estas ondulaciones en la membrana de una forma independiente de los factores de crecimiento e internalizarse mediante esta vía (Mercer & Helenius, 2009).

Las quinasas Rac y Pak desempeñan un importante papel en la regulación de la macropinocitosis. Estas colocalizan en las ondulaciones de la membrana plasmática y de las vesículas. Además, la quinasa Pak tiene como sustrato a LIMPK, que a su vez, fosforila e inactiva a la cofilina, una

proteína implicada en la despolimerización de la actina, mediando así en la formación del macropinosoma. Aunque Pak juega un papel central en la macropinocitosis, también la promueven la actividad de otras quinasas, como PI3, Ras y Src (Dharmawardhane *et al.*, 2000; Falcone *et al.*, 2006) y de Arf6, una proteína perteneciente a la familia de factores de ribosilación de ADP (Haga *et al.*, 2009).

Otra vía de internalización de material en las células es la **fagocitosis**, que tiene lugar solamente en células fagocíticas especializadas en las que el material particulado y opsonizado puede ser captado e introducido en las células (Koval *et al.*, 1998). Esta forma de endocitosis requiere una mayor superficie de membrana que la endocitosis mediada por clatrina o por caveolas, por lo que puede observarse fácilmente mediante microscopía de contraste de fases. Se han descrito diversas variaciones en el proceso de fagocitosis en distintas células. Así, el análisis morfológico ha revelado un proceso probablemente relacionado con la fagocitosis llamado entosis (Overholtzer *et al.*, 2007) y que consiste en la entrada de una célula viva en el citoplasma de otra.

Finalmente, además de las anteriores y de otras formas de endocitosis, se han aportado pruebas de endocitosis en compartimentos tubulares que se forman en células de mamífero (Olazabal *et al.*, 2002). Así, estudios de microscopía electrónica han permitido visualizar esos intermediarios tubulares de la endocitosis que son responsables de la internalización de una gran variedad de ligandos. Se desconoce cómo se forman estas estructuras.

1.3.2.2. Transporte de enzimas lisosomales y reciclaje de sus receptores

El sistema endosomal también está implicado en la clasificación y transporte de las enzimas lisosomales hacia los lisosomas. En las células de mamíferos, las enzimas hidrolíticas se sintetizan en los ribosomas asociados a la membrana externa del retículo endoplásmico y, aparte de

otras modificaciones en su recorrido por el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, en la red *cis* de este último se une a la enzima lisosomal un grupo funcional de manosa-6-fosfato (Kornfeld, 1992). En estas células, la clasificación y el transporte de las hidrolasas a lisosomas está mediado por receptores que reconocen a la manosa-6-fosfato y que se denominan receptores de manosa-6-fosfato (MPR) (Arighi *et al.*, 2004). Los MPR se encuentran sobre todo en la red *trans* del complejo de Golgi (TGN), aunque también pueden localizarse en la membrana plasmática. Existen dos MPR: el dependiente de cationes, de 46 kDa (CD-MPR) y el independiente de cationes, de 300 kDa (CI-MPR). Ambos receptores son proteínas transmembrana de tipo I, es decir que poseen el extremo N-terminal en la porción extracelular, y comparten cierta homología de secuencia en sus respectivos dominios luminales (Robinson & Bonifacino, 2001). Las MPR se distribuyen en el interior de las vesículas recubiertas de clatrina que se forman en la TGN y en la membrana plasmática (Hawkes & Kar, 2004). Esto permite que las hidrolasas lisosomales en tránsito por el complejo de Golgi o en el medio extracelular, adonde han podido escapar algunas de ellas por secreción constitutiva, se transporten hasta un compartimento endosomal en su camino hacia los lisosomas. Para mantener la eficiencia del transporte anterógrado de hidrolasas desde el complejo de Golgi al endosoma es crucial una recuperación del receptor desde los endosomas hasta la TGN, ya que errores en el reciclaje de los receptores conllevaría su destrucción en el lisosoma, lo que supondría un desperdicio energético importante (Cullen, 2008). Esa recuperación eficiente de los MPR desde los endosomas a la TGN, tras la liberación al endosoma de las hidrolasas lisosomales, lo lleva a cabo un complejo llamado retrómero. Aunque no ha habido un consenso total (Carlton *et al.*, 2005), el retrómero de los mamíferos se supone formado por dos subcomplejos, uno dimérico llamado SNX (*sorting nexin*), formado por dos proteínas SNX (SNX1-SNX2 o SNX5-SNX6) y que regula la tubulación endosomal inicial (Cullen, 2008; Griffin *et al.*, 2005; Rojas *et al.*, 2007; Wassmer *et al.*, 2007) y otro formado por las proteínas Vps26,

Vps29 y Vps35 (*vacuolar protein sorting-associated*) y encargado del reconocimiento de los MPR (Rojas *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2008; Utskarpen *et al.*, 2007; Vergés, 2007; Vergés, 2008). Aunque el retrómero puede transportar otras proteínas, el transporte mejor caracterizado es el del CI-MPR (Arighi *et al.*, 2004; Seaman, 2004).

1.4. Regulación de la degradación intracelular de proteínas

Tanto el tráfico de enzimas lisosomales como el reciclaje de receptores, los procesos de endocitosis y la degradación de proteínas por parte de las diferentes vías son procesos de vital importancia para la supervivencia celular y, por ello, se encuentran altamente regulados. En lo referente a la degradación intracelular de proteínas, el aspecto que probablemente destaca más es que no todas las proteínas se degradan con la misma velocidad, sino que existen notables diferencias entre ellas. Habitualmente, estas se expresan en términos de «vida media» de las proteínas, o tiempo requerido para degradar la mitad de las moléculas de una proteína presentes en la célula en un momento determinado. Puesto que las vidas medias de las diferentes proteínas de una misma célula pueden variar entre unos pocos minutos hasta algunas semanas, es evidente que la célula debe disponer de mecanismos que le permitan discriminar, en una situación determinada, qué proteínas deben degradarse y cuáles no y en estos mecanismos jugarían un importante papel señales a nivel de la proteína sustrato que se va a degradar: secuencias en la estructura primaria como la KFERQ, modificaciones covalentes como fosforilaciones y ubiquitinaciones, etc. Pero, además, la vida media de una proteína no es una propiedad intrínseca de ella sino que varía también con las condiciones ambientales en las que se encuentra la célula. Por ejemplo, la privación de suero o de nutrientes a un cultivo celular reduce considerablemente la vida media de casi todas las proteínas celulares. Por lo tanto, la actividad de los diferentes mecanismos proteolíticos debe estar también regulada, siendo una de las

características más importantes de la degradación intracelular de proteínas. Esta característica afecta sobre todo a la macroautofagia.

Los reguladores más conocidos de las vías degradativas son los hormonales (insulina, glucagón) y los nutricionales (aminoácidos) (Kadowaki & Kanazawa, 2003; Kanazawa *et al.*, 2003). Los primeros indicios de su papel regulador se obtuvieron hace tiempo ya, sobre todo a partir de estudios de la actividad macroautofágica hepática (Grinde & Seglen, 1981; Miotto *et al.*, 1994; Mortimore & Pösö, 1984; Seglen & Gordon, 1984) en los que se demostró que la insulina y los aminoácidos inhiben la degradación de proteínas y el glucagón la incrementa. Más recientemente, también se han realizado numerosos estudios en los que se demuestra que la insulina y los aminoácidos inhiben la vía macroautofágica de degradación intracelular de proteínas en células musculares (Kadowaki & Kanazawa, 2003; Kanazawa *et al.*, 2003). Sin embargo, esta información es todavía muy fragmentaria para otras células y para otros reguladores, a pesar de su enorme importancia en fisiología y patología.

Como respuesta a la carencia de aminoácidos, como ocurre en el ayuno, se activa, en diversas células, la vía macroautofágica para producir los aminoácidos necesarios para sintetizar proteínas esenciales para la supervivencia de la célula y, también, para producir energía a través de la gluconeogénesis. Además, puesto que los aminoácidos son también productos de la macroautofagia, no sorprende que ellos mismos sean inhibidores de este proceso (Esteban *et al.* 2007; Fuertes *et al.*, 2003b; Jousse *et al.*, 2004; Klionsky, 2005; Proud, 2004; Yoshizawa, 2004).

En mamíferos, las vías de señalización a las que se les ha atribuido un papel central en la regulación por insulina y aminoácidos de la macroautofagia implican principalmente al sensor nutricional mTOR (proteína quinasa diana de rapamicina, a través de la vía PI3K-AKT) y al sensor energético AMPK (proteína quinasa activada por AMP) y, de forma más secundaria, a diversas quinasas como las MAPK (proteína quinasas activadas por mitógenos), ERK1/2 (proteína MAP quinasa 1/2 regulada por

señales extracelulares), p38 y JNK (quinasas N-terminales c-Jun) (Casas-Terradellas *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2008; Sui *et al.*, 2014). El papel central en la regulación de la degradación intracelular de proteínas (Beugnet *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2004; Kanazawa *et al.*, 2003; Proud, 2002; Tokunaga *et al.*, 2004; Tremblay & Marette, 2001) a través de todas estas vías de señalización y, en concreto, de la macroautofagia, lo desempeña sobre todo mTOR (Chen & Fang, 2002; Fisher *et al.*, 2005; Gual *et al.*, 2005; Kahn *et al.*, 2005; Katsanakis & Pillary, 2005; Nobukuni *et al.*, 2005; Yasukawa *et al.*, 2005). Esta quinasa se activa en presencia de factores de crecimiento y de altos niveles de aminoácidos o de insulina e inhibe la macroautofagia.

Aunque existen vías de regulación de la degradación intracelular de proteínas que, aparentemente, son independientes de mTOR (Moruno *et al.*, 2012), las vías dependientes de PI3K/AKT, de AMPK y de las MAPK pasan mayoritariamente a través del complejo mTORC1. Por ejemplo, la activación de mTORC1 en presencia de insulina se produce a través de la quinasa PI3K de clase I, que fosforila (activa) a AKT y que, a través de una serie de pasos produce la activación de mTORC1 (Sancak *et al.*, 2010). Esta activación tiene dos efectos diferentes. Por un lado, fosforila algunos de los principales efectores implicados en la iniciación de la síntesis de proteínas, como la proteína quinasa p70 S6K (con la proteína ribosomal S6 como sustrato, cuya fosforilación induce la síntesis de proteínas en el ribosoma), y el supresor del inicio de traducción eucariótico 4E-BP1 (proteína de unión a 4E) (Holz & Blenis, 2005). Por otro lado, la activación de mTOR inhibe la macroautofagia a través de la fosforilación de un determinado residuo (S757) de Ulk en mamíferos (Atg13 en levaduras) al impedir la unión de AMPK. Ulk forma parte de un complejo de iniciación de la nucleación de la membrana del autofagosoma que finalmente permitirá el secuestro de la porción del citoplasma para ser degradado. Durante este proceso de nucleación y formación, se lipida la proteína LC3-I con la unión de una fosfatidiletanolamina (Taherbhoy *et al.*, 2011), para formar la proteína LC3-II

ampliamente utilizada como marcador de la macroautofagia, al tratarse de la proteína conocida más específica de estas estructuras (Kimura *et al.*, 2008).

Investigaciones realizadas en fibroblastos humanos en nuestro laboratorio parecen indicar que tanto los aminoácidos como la insulina inhiben la degradación de proteínas por vías diferentes, ya que sus efectos son aditivos (Esteban *et al.*, 2007). De esta manera, las diferentes vías de señalización de esas señales no se solaparían, sino que convergerían a nivel de mTOR o bien serían independientes de esta quinasa como ocurre en el caso de la privación de glucosa (Moruno *et al.*, 2012). En fibroblastos humanos existen además otras diferencias respecto a otros tipos celulares en cuanto al efecto regulador de los aminoácidos en la degradación intracelular de proteínas. Por ejemplo, en hígado de rata la leucina, glutamina, tirosina, fenilalanina, prolina, metionina, triptófano e histidina tienen un papel regulador. Sin embargo, en fibroblastos humanos la arginina y, posiblemente, la cisteína son reguladores, mientras que la leucina, glutamina, prolina y la histidina no lo son o lo son muy débilmente. Es de destacar aquí, sobre todo, la ausencia de inhibición de la degradación intracelular de proteínas en fibroblastos por parte de la leucina, puesto que este aminoácido la inhibe tanto en hígado como en músculo esquelético y adipocitos y está considerado como la principal señal de la disponibilidad celular de aminoácidos en el organismo (Mortimore & Pösö, 1984; Seglen & Gordon, 1984). Por tanto, la regulación de la proteólisis es un proceso complejo que puede variar dependiendo del tipo celular, lo que hace que esté aún lejos de poder comprenderse en su totalidad (Tesseraud *et al.*, 2007). Esto supone que la contribución a la proteólisis celular de los diferentes sistemas de degradación de proteínas varíe según el tipo celular y las condiciones ambientales en las que se encuentran las células. Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que tanto la macroautofagia como los proteasomas son las vías más importantes de degradación intracelular de proteínas en fibroblastos humanos (Fuertes *et al.*, 2003b). Además, las dos pueden ser reguladas tanto por factores hormonales (por ejemplo, la insulina que hemos utilizado aquí) como por

factores nutricionales (por ejemplo, los aminoácidos que también hemos utilizado en este trabajo), aunque es la macroautofagia la principal vía sujeta a esa regulación (Fuentes *et al.*, 2003b).

La acumulación progresiva de material sin degradar que se observa en el interior de los lisosomas de pacientes de las diferentes enfermedades de almacenamiento lisosomal y, en este caso, de lipofuscinosis ceroida neuronal, indica que el funcionamiento y probablemente también la regulación, de los sistemas degradativos de estas células está alterado. Lógicamente, esta alteración debe afectar con mayor probabilidad a los lisosomas. En esta línea, Settembre y cols. demostraron cómo la inhibición de la formación de autofagosomas con 3-metiladenina (3-MA) en fibroblastos humanos en cultivo provoca la acumulación de material de tipo lipofuscina (Settembre *et al.*, 2008), lo que indica que algunos componentes de los autofagosomas corriente arriba del propio proceso degradativo son necesarios para la correcta degradación lisosomal.

Por lo que se refiere a las dos variantes de lipofuscinosis ceroida neuronal, LINCL y JNCL, estudiadas en este trabajo, ambas comparten la acumulación en el interior de los lisosomas de moléculas sin degradar, sobre todo de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial. Sin embargo, estas dos variantes se diferencian en la edad de aparición y en la esperanza de vida de los pacientes. Por ello, en el presente trabajo hemos analizado en fibroblastos humanos de pacientes con mutaciones en *CLN2* y *CLN3* posibles alteraciones en los procesos en los que intervienen los lisosomas (autofagia y endocitosis) y que pudieran explicar las similitudes y las diferencias que se observan en los pacientes de LINCL y JNCL.

1.5. Planteamiento de objetivos

El objetivo general de nuestro laboratorio es, por un lado, investigar los mecanismos y la regulación de las principales vías de degradación intracelular de proteínas y, por otro, determinar la relevancia de alteraciones en estos procesos en la patogenia de enfermedades raras.

En este trabajo hemos estudiado, en relación con la segunda parte de ese objetivo, las lipofuscinosis ceroides neuronales y, en concreto, sus dos variantes más frecuentes, la infantil tardía (LINCL) y la juvenil (JNCL). En ambas se acumula material sin degradar en el interior de los lisosomas y presentan fenotipos clínicos muy similares, aunque los genes afectados son diferentes y el momento de aparición de los síntomas de la enfermedad es también distinto.

Por eso, en esta tesis doctoral hemos planteado **analizar, de manera comparativa y empleando fibroblastos de pacientes con lipofuscinosis ceroides neuronales infantil tardía y juvenil, las similitudes y las diferencias de posibles alteraciones en el funcionamiento normal de los lisosomas**, estudiando concretamente:

- 1. Los sistemas de degradación intracelular de proteínas, especialmente la macroautofagia.**
- 2. Las vías de señalización que regulan la macroautofagia.**
- 3. El tráfico vesicular, tanto en las principales vías endocíticas como en el transporte de enzimas lisosomales.**

METODOLOGÍA

2. METODOLOGÍA

2.1. Material

2.1.1. Aparatos

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro UV-Visible Helios de Unicam Ltd. (Cambridge, Reino Unido) y las fluorimétricas y luminométricas con un espectrómetro M5/SpectraMax de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, EE. UU.). Los experimentos de citometría de flujo se realizaron con el citómetro FACSCalibur de BD Biosciences (Nueva Jersey, EE. UU.). Para la observación de células por fluorescencia se utilizó el microscopio modelo Observer Z1 (acoplado a una cámara fotográfica para la toma de imágenes AxioCam MRm y a un sistema de seccionamiento óptico ApoTome, todos de Carl Zeiss). Las imágenes de microscopía confocal se tomaron mediante un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS (Leica Cambridge Ltd., Cambridge, Reino Unido).

Las muestras de microscopía electrónica se seccionaron en un ultramicrotomo LKB 4801 A de LKB-Microtomy Systems (Leica Cambridge Ltd.) y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión CM-10 de Philips (Eindhoven, Holanda).

La campana de flujo laminar para trabajar en esterilidad con los cultivos celulares es de Telstar Bio II A (Tarrassa, España). La estufa de CO₂ para el mantenimiento de los cultivos celulares es el modelo TC2323 de Shel Lab (Sheldon Manufacturing Inc., Cornelius, OR, EE. UU.).

Otros equipos (microscopios, estufas, baños, neveras, congeladores, agitadores, centrifugas de mesa, balanzas, equipos de electroforesis y de transferencia, pH-metros, etc.) fueron los habituales en un laboratorio de biología celular y molecular.

2.1.2. Líneas celulares

Se utilizaron los siguientes fibroblastos de la colección de células Coriell (Coriell Institute for Medical Research, Camdem, NJ, EE. UU.): GM03349 (un varón control de 10 años de edad), GM03348 (un varón control de 10 años de edad), GM01582 (una mujer control de 12 años de edad), GM09404 (una mujer de 11 años de edad, paciente de la variante infantil tardía de lipofuscinosis ceroidea neuronal, y con una mutación I287N en el gen *CLN2*) y GM16486 (un varón de edad desconocida, paciente con la variante infantil tardía de lipofuscinosis ceroidea neuronal, y con dos mutaciones en el gen *CLN2*, una de cambio de sentido R127Q en el exón 4 de un alelo y el otro alelo con un defecto de *splicing* IVS5-1G>C). Además, los fibroblastos se obtuvieron a partir de explantes de piel (ver apartado 2.1.1) de dos pacientes españoles: MPA (un varón de 5 años de edad de la variante infantil tardía de lipofuscinosis ceroidea neuronal, con una mutación S475L en el gen *CLN2*) y MPL (un varón de 13 años de edad de la variante juvenil de lipofuscinosis ceroidea neuronal, con la mutación más prevalente en JNCL, una delección de 1,02 kb en el gen *CLN3*). Se utilizaron linfoblastos humanos control (GM0131B, procedentes de una donante de 23 años de edad) y de pacientes con la delección de 1,02 kb en *CLN3* (GM08794 y GM08820, procedentes de un hombre de 26 años de edad y de una mujer de 14 años de edad, respectivamente), todos ellos procedentes también de la colección de células Coriell.

2.1.3. Material químico y bioquímico

2.1.3.1. Anticuerpos

Los anticuerpos específicos de EGFR (T-845), de Akt (T-308 o S-463), de las MAPK p38 α (T-180/Y-182) y ERK1/2 (T-202/Y-204), de p70 S6K (T-389) y de 4E-BP1 (T-37/46) para sus formas fosforiladas y no fosforiladas, se adquirieron de Cell Signaling Technologies (Danvers, MA, EE. UU.). Los

anticuerpos específicos frente a la transferrina, CI-MPR, TGN38 y LAMP1 (clon 14DB) utilizados en inmunocitoquímica, se compraron en Abcam (Cambridge, Reino Unido). El anticuerpo anti-LC3B (clon 5F10) procedía de Nanotools (Teningen, Alemania); el anticuerpo FK2 contra proteínas mono y poliubiquitinadas se obtuvo de Biomol International Lp (Exeter, Reino Unido), los anticuerpos anti-catalasa, anti-tubulina, anti- β -actina. Los anticuerpos secundarios marcados con la peroxidasa de rábano picante (HRP) se adquirieron en Sigma Chemical Co. (Missouri, EE. UU) y la IgG (H+L) de cabra anti-IgG de conejo unida a Alexa Fluor® 488 (AF488) se adquirió de Life Technologies (Waltham, EE. UU.). El anticuerpo frente a CI-MPR utilizado en los experimentos de *Western-blot* fue un obsequio del Dr. B. Hoflack (Technische Universität Dresden, Dresden, Alemania) y los anticuerpos frente a las subunidades del retrómero (Haft *et al.*, 2000), cortesía de los Dres. C. R. Haft y J. Bonifacio (investigadores del NIH, Bethesda, EE. UU.).

2.1.3.2. Material para electroforesis

Para preparar los geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida-bisacrilamida en proporción 29:1, N,N,N',N'-tetrametiletilenamina (TEMED) y persulfato amónico, todo ello de Bio-Rad Laboratories (Richmond, EE. UU.). Los marcadores de peso molecular de proteínas que se utilizaron fueron: BenchMark™ pre-stained protein ladder de Life Technologies y Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers de Amersham Biosciences (Buckinghamshire, Reino Unido).

2.1.3.3. Medios utilizados para cultivos de células animales

El medio mínimo esencial MEM-4655, el medio RPMI 1640, la tripsina/EDTA (mezcla de tripsina al 0,04 % y de EDTA al 0,02 %), el dimetilsulfóxido (DMSO) y la insulina humana procedían de Sigma Chemical Co. Los aminoácidos esenciales MEM 50x, los aminoácidos no esenciales MEM 100x, la penicilina (10.000 U/ml), la estreptomina (10.000 μ g/ml), las

vitaminas MEM 100x y el suero bovino fetal (FBS) se adquirieron de Life Technologies. El agua bidestilada estéril era de Laboratorios Braun (Barcelona, España). El azul de tripán era de Flow Laboratories (Irvine, Reino Unido). Los filtros (0,2 μm) utilizados en la esterilización de soluciones eran de Schleicher y Schuell (Keene, NH, EE. UU.). El material de plástico utilizado para el mantenimiento y cultivo de las células eucariotas era de Corning-Costar Corporation (Badhoevedorp, Holanda).

2.1.3.4. Inhibidores

La leupeptina, el MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-aldehído) y la lactacistina procedían de Peptide Institute Inc. (Osaka, Japón). El fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), la 3-metiladenina (3-MA), el cloruro de amonio (NH_4Cl), la pepstatina A, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la cicloheximida (CHX), la bafilomicina A1, el fluoruro sódico (NaF), el ortovanadato sódico (Na_3VO_4) y el pirofosfato sódico ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) procedían de Sigma Chemical Co.

2.1.3.5. Material para microscopía electrónica

Como fijadores se emplearon glutaraldehído al 25 % y paraformaldehído (PFA) al 20 %, ambos de Tousimis (Rockville, MD, EE. UU.) y el tetróxido de osmio (2 %) de Polysciences (Warrington, PA, EE. UU.). En la tinción de las muestras se empleó acetato de uranilo, de Merck & Co. (Darmstadt, Alemania) y citrato de plomo (preparado a partir de acetato trisódico 120 mM y nitrato de plomo 78 mM, como se describe en Reynolds, 1963). La resina empleada para incluir fue Epon-812 de Agar Scientific Ltd. (Stansted, Essex, Reino Unido). Las rejillas de cobre de 200 mallas eran de EMscope Laboratories Ltd. (Ashford, Reino Unido).

2.1.3.6. Kits comerciales

Para la cuantificación de la concentración de proteínas, se empleó el BCA Protein Assay Kit de Pierce-Thermo Fisher Scientific (Rockford, EE. UU.). Para medir la actividad de los proteasomas de los fibroblastos en placas de cultivo de 96 pocillos se utilizó el kit de luminiscencia Proteasome-Glo Cell-Based Assay de Promega (Madison, EE. UU.). El kit de luminiscencia para el revelado por *Western-blot*, Lumi-Light Western Blotting Substrate, se adquirió de Roche (Basilea, Suiza).

2.1.3.7. Otros materiales

La EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin (NHS-SS-Biotina) y la resina NeutrAvidin Agarosa se adquirieron de Thermo Fisher Scientific. La ribonucleasa A, la nigericina, la monensina, la estreptavidina, el L-glutati6n (reducido), la AAPCMK (Ala-Ala-fenil-clorometilcetona), el Purpald (4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol), el isotiocianato de fluoresceína unido a dextrano de 40 kDa (FITC-dextrano), el CCCP (cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona), la monodansilcadaverina (MDC), el Nonidet P-40, el desoxicolato s6dico, el PFA, el MES y el Trit6n X-100 se obtuvieron de Sigma Chemical Co. La valina tritiada se adquiri6 de Hartmann Analytic GmbH (Braunschweig, Alemania). El reactivo de transfecci6n de c6lulas aucariotas X-tremeGENE 9, las membranas de PVDF (floururo de polivilideno) se obtuvieron de Roche. El reactivo FluorSave procedi6 de Calbiochem (Barcelona, Espa6a) y un sustrato espec6fico para la enzima TTP1, la AAF-AMC (Ala-Ala-fenil-7-amino-4-metilcumarina), se obtuvo de Bachem Bioscience (Bubendorf, Suiza). El factor de crecimiento epid6rmico (EGF) y el EGF recombinante (PHG0311) humanos, el TMRM (metil 6ster de tetrametilrodamina), el EGF unido al fluor6foro AF488 (AF488-EGF), la dihidrorrodamina 123 (DHR-123), la hidroetidina (HE) y el yoduro de propidio (IP) se adquirieron de Life Technologies.

Otros reactivos, como el per6xido de hidr6geno (H₂O₂), la alb6mina de suero bovino (BSA), el 6cido tricloroac6tico, el cloroacetato, etc., fueron de la mejor

calidad analítica disponible y procedían de Merck & Co., Roche, Panreac Química S.A. (Barcelona, España) y Riedel-de Hæn (Seelze, Alemania).

El vector de expresión de pEGFP-LC3 fue cedido por el Dr. N. Mizushima (investigador en The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Sciences, Tokyo, Japón).

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo de células animales

2.2.1.1. Obtención de fibroblastos a partir de un explante de piel procedente de un donante

A partir de una biopsia de piel procedente de un varón diagnosticado clínicamente como enfermo de JNCL, obtenida en el hospital La Fe de Valencia se prepararon fibroblastos humanos siguiendo la normativa vigente sobre el manejo de muestras clínicas. Trabajando en esterilidad, el explante se pasó a un tubo donde se lavó 4 veces a temperatura ambiente con 20 ml de medio MEM que contenía los siguientes antibióticos: 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomina y 50 µg/ml de gentamicina. Posteriormente, el explante se pasó a una placa Petri de vidrio estéril y se troceó con la ayuda de dos bisturís, evitando su deshidratación. Después, los trozos se pasaron a un tubo estéril y se lavaron de nuevo, 3 veces, con 10 ml del mismo medio. Una vez lavados, se colocaron en una placa de cultivo de 21 cm². Tras retirar todo el medio, se añadió sobre cada uno de los trozos una gota de FBS sin inactivar. La placa se mantuvo unos 10 min en la campana de flujo laminar a temperatura ambiente para facilitar la adhesión de los fragmentos a la superficie de la placa. Una vez adherido el tejido, se añadió con cuidado 1 ml de medio MEM completo (idéntico al descrito anteriormente) con 15 % de FBS sin inactivar y se incubó a 37 °C en la estufa con un 5 % (v/v) de CO₂/aire.

Al día siguiente, se añadió medio de cultivo fresco completo con suero y, tras unos días, se detectó el crecimiento de células epiteliales. Cada día se lavaban las células y se añadía medio fresco completo con suero. Tras unos 15 días de cultivo, ya se observó la migración de fibroblastos desde los explantes. Tras 4 semanas en cultivo, los fibroblastos se encontraban semiconfluentes en la placa. En ese momento se despegaron las células con tripsina/EDTA y se pasaron a un nuevo frasco de cultivo. A partir de entonces, los fibroblastos se cultivaron en las mismas condiciones que los otros fibroblastos utilizados en este trabajo (ver siguiente apartado).

2.2.1.2. Condiciones de cultivo de los fibroblastos

Con el fin de conservar un stock de células, se congelaron alícuotas de los cultivos por métodos estándar en una solución de DMSO al 10 % en FBS, utilizando un recipiente de congelación Nalgene (Nalge Company, Rochester, NY, EE. UU.).

Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con un 80 % de humedad relativa y un 5 % (v/v) de CO₂/aire, utilizando el medio mínimo esencial (MEM, *Minimum Essential Medium*) con sales de Eagle y suplementado con L-glutamina 2 mM, aminoácidos esenciales MEM 1x, aminoácidos no esenciales MEM 1x, vitaminas MEM 1x, penicilina (100 U/ml), estreptomina (100 µg/ml) y 15 % de FBS sin inactivar. A este medio lo llamaremos a partir de ahora medio de cultivo de fibroblastos. Estos cultivos se mantenían, cambiando el medio cada tres días, hasta que alcanzaban la densidad deseada para cada experimento, calculada en base a curvas de crecimiento realizadas previamente en el laboratorio y verificadas experimentalmente cada vez. Para determinar la densidad y viabilidad celulares se utilizaban, respectivamente, un hemocitómetro Bürker y la prueba de exclusión del azul tripán (Flow Laboratories, McLean, Virginia, EE. UU.). Todos los experimentos se realizaron en los pases 10 al 14 para evitar los efectos del envejecimiento de las células del cultivo.

Para las condiciones de alta proteólisis (ayuno) se utilizó el medio Krebs-Henseleit (KH: NaCl 118,4 mM, KCl 4,75 mM, KH_2PO_4 1,19 mM, MgSO_4 2,54 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,44 mM, NaHCO_3 28,6 mM y glucosa 10 mM, con Hepes 10 mM, pH 7,4) (Fuertes *et al.*, 2003b). Para las condiciones de baja proteólisis se utilizó el medio de cultivo de fibroblastos o el medio KH suplementado con 0,1 mM de insulina y aminoácidos esenciales al doble de la concentración presente en el medio de cultivo de fibroblastos (Fuertes *et al.*, 2003a y b).

2.2.1.3. Condiciones de cultivo de los linfoblastos

Puesto que los linfoblastos son un tipo celular que crece en suspensión, los cultivos se expandían mediante simple dilución con medio fresco a razón de 1:4 o 1:5 cuando se encontraban en fase estacionaria. Para su crecimiento, el medio utilizado fue RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) suplementado con un 15 % de FBS inactivado (la inactivación del suero se produce al calentarlo durante 30 min a 56 °C) y antibióticos (100 U/ml de penicilina y 100 µg de estreptomicina/ml, concentración final). La densidad del cultivo se mantuvo entre 200.000 y 1.000.000 de células viables/ml. La situación de 1.000.000 células/ml se consideró equivalente a una fase de detención del crecimiento, ya que si se mantenía el cultivo más tiempo a esta densidad, disminuía su viabilidad.

2.2.2. Morfología lisosomal mediante microscopía electrónica convencional

La microscopía electrónica se llevó a cabo tal como se indica en Knecht *et al.*, 1984. Brevemente, las muestras se sedimentaron por centrifugación a 100 g durante 10 min y se fijaron por inmersión, durante 2 h a 4 °C, en solución de fijación A (glutaraldehído al 2,5 % y PFA al 2 % en tampón cacodilato sódico 0,1 M, sacarosa 0,1 M, MgCl_2 0,1 % y CaCl_2 0,05 %, pH 7,3). A continuación, se lavaron durante 12 h a 4 °C en la misma solución A sin los fijadores. Se realizó una nueva fijación en solución de fijación B (tetróxido de osmio al 1 % en tampón veronal-acetato 0,1 M, con

sacarosa 0,1 M a pH 7,3), durante 45 min a 4 °C en oscuridad y un lavado de 30 min en la solución de Ringer (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM). La deshidratación de las muestras ya fijadas se realizó a 4 °C con una serie de mezclas de acetona/agua a concentraciones crecientes de acetona (50 %, 70 %, 95 % y 100 %), durante 15 min en cada una. La acetona del 70 % llevaba además acetato de uranilo al 0,5 % (p/v) y ácido fosfotúngstico al 1 % (p/v). Tras la infiltración en mezclas Epon-812:acetona e inclusión en Epon-812, preparado según las instrucciones del fabricante, las piezas se seccionaron en un ultramicrotomo LKB 4801 A de LKB-Microtomy Systems (Leica Cambridge Ltd.) y las secciones ultrafinas se montaron sobre rejillas de cobre de EMScope Laboratories Ltd. Después de un contraste adicional con citrato de plomo (preparado a partir de citrato trisódico 120 mM y nitrato de plomo 78 mM, como se describe en Reynolds, 1963, las muestras se observaron en un microscopio electrónico CM-10 de Philips.

2.2.3. Determinación de la actividad de TPP1

Las células en crecimiento exponencial se homogeneizaron con Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en tampón de acetato sódico 50 mM pH 4,0, que contenía inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, leupeptina 100 µM, pepstatina A 1 µM) y EDTA 5 mM. Los lisados se centrifugaron a 12.000 g durante 25 min a 4 °C. Las proteínas de los sobrenadantes se midieron mediante el método de Lowry-deoxicolato (Martín de Llano *et al.*, 2000), y se utilizaron 10 µg de proteínas por ensayo. Se utilizó AAF-AMC a una concentración 100 µM como sustrato de TPP1, en 100 µl de Tritón X-100 al 0,1 % (v/v) en tampón acetato sódico 0,1 M, pH 4,0. La reacción se detuvo con 50 µl de cloroacetato sódico 100 mM y acetato sódico 20 mM. La actividad de TPP1 se calculó por diferencia entra la fluorescencia obtenida en ausencia y en presencia de AAPCMK 1 µM, un inhibidor específico de TPP1. La fluorescencia se midió en un lector de placas M5/SpectraMax de Molecular Devices y los resultados se normalizaron para el contenido de proteínas del ensayo. Para las medidas del efecto del pH sobre la actividad de la enzima

TPP1, se prepararon diferentes tampones con acetato sódico o MES con valores de pH entre 3,0 y 6,5.

2.2.4. Medición de la degradación intracelular de proteínas

Los experimentos se realizaron tal y como está descrito en Fuertes *et al.*, 2003a y b. Brevemente, las proteínas de vida media corta o larga se marcaron con 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H] valina durante 15 min o 24 h, respectivamente. A continuación, los fibroblastos se lavaron tres veces con medio de cultivo de fibroblastos que contenía L-valina 10 mM. Se analizó la liberación neta al medio de cultivo de radioactividad soluble en ácido tricloroacético al 5 %, procedente de las células marcadas, para los tiempos y condiciones de cultivo indicadas. La toma de muestras empezaba o bien inmediatamente tras los lavados mencionados arriba (para las proteínas de vida media corta), o bien después de una caza de 24 h en medio de cultivo de fibroblastos que contenía L-valina 10 mM (para las proteínas de vida media larga) con el fin de degradar previamente las proteínas de vida media corta. La degradación de proteínas se expresó como porcentaje de la proteína inicial que se degrada por hora y las velocidades de degradación se calcularon a partir de la recta resultante de la regresión de mínimos cuadrados de la caída de radioactividad durante el tiempo de caza en representaciones semilogarítmicas. La contribución de las diversas vías proteolíticas se calculó utilizando NH_4Cl 20 mM y leupeptina 0,1 mM (para inhibir la degradación por el conjunto de las vías lisosomales: macroautofagia, microautofagia, autofagia mediada por chaperonas, etc., ver Knecht *et al.*, 2009), 3-metiladenina 10 mM (para inhibir solo la macroautofagia) y lactacistina 10 μM (para inhibir los proteasomas).

2.2.5. Cuantificación de la autofagia

2.2.5.1. Western-blot de LC3

Los cultivos de fibroblastos se crecieron hasta confluencia y se incubaron en condiciones de alta y baja proteólisis (ver apartado 1.2), con y sin inhibidores de los lisosomas. Como inhibidores lisosomales se usaron bafilomicina A1 500 nM o NH_4Cl más leupeptina (20 mM y 0,1 mM, respectivamente) durante 1 h con resultados similares (Esteve *et al.*, 2010).

Las células se recogieron y homogeneizaron con tampón RIPA (NaCl 150 mM, Nonidet P-40 1 % (v/v), deoxicolato sódico 0,5 %, SDS 0,1 %, Tris 50 mM, pH 8,0) al que se añadió leupeptina 0,1 mM y PMSF 1 mM. Los extractos crudos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes se recogieron para los experimentos de *Western-blot*. Las proteínas (75 µg) de los diferentes lisados se separaron utilizando geles SDS-PAGE al 15 %, se transfirieron a membranas de PVDF y se analizaron con anticuerpos anti-LC3B. La actina, proteína de expresión constitutiva, se utilizó para normalizar los resultados.

2.2.5.2. Inmunocitoquímica de LAMP1

Las células en cubreobjetos de vidrio se fijaron durante 10 min con una solución de PFA al 4 % en tampón fosfato salino (PBS). Después de tres lavados de 5 min con PBS, las células se permeabilizaron con Tritón X-100/PBS al 0,1 % (v/v) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron con PBS y se bloquearon con FBS al 4 % en PBS durante 30 min. A continuación, las células se incubaron con el anticuerpo anti-LAMP1 durante toda la noche a 4 °C. Tras una serie de tres lavados con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con AF488 durante 1 h a 20 °C. La dilución final de ambos anticuerpos fue de 1:500 en PBS con 2 % de BSA. Los portaobjetos se montaron utilizando el reactivo FluorSave y se observaron con un microscopio de fluorescencia Observer Z.1 acoplado con un sistema de seccionamiento óptico ApoTome (Carl Zeiss, Inc.).

2.2.5.3. Transfección con pEGFP-LC3

Para estudiar la autofagia mediante la fluorescencia de pEGFP-LC3, los fibroblastos humanos se sembraron unas 24 h antes de comenzar el experimento en placas de 24 pocillos a una densidad de 60.000 células por pocillo. A continuación, se transfectaron con 0,5 µg de pEGFP-LC3, utilizando el reactivo de transfección de ADN X-tremeGENE 9 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de transfección se incubó durante 12 h a 37 °C y se sustituyó por el medio de cultivo de fibroblastos, en el que se incubaron las células durante 48 h más. Después, las células se fijaron durante 10 min con una solución de PFA al 4 % en PBS y se montaron sobre portaobjetos como se ha descrito anteriormente (ver apartado 2.5.2).

Para analizar la autofagia en las células, se contaron los puntos fluorescentes de EGFP-LC3 en un mínimo de 40 células positivas para EGFP con un microscopio de fluorescencia Observer Z.1 acoplado a un sistema de seccionamiento óptico ApoTome (Carl Zeiss, Inc.). Una célula se consideró positiva para EGFP si tenía más de cinco vesículas fluorescentes (Ghislat *et al.*, 2012).

2.2.5.4. Fluorescencia de monodansilcadaverina

Los experimentos de MDC se realizaron del mismo modo que en trabajos anteriores (Esteban *et al.*, 2007). Las células se incubaron durante 3 h a 37 °C en medio de alta proteólisis y en los últimos 15 min se añadió la MDC a una concentración final de 100 µM. Después de tres lavados con PBS a temperatura ambiente, las células: a) se montaron en portaobjetos tal y como se ha descrito anteriormente para su visualización mediante microscopía de fluorescencia y, por otro lado, b) se analizaron utilizando un lector de microplacas M5/SpectraMax de Molecular Devices (longitud de onda de excitación de 380 nm, longitud de onda de emisión de 525 nm) para medir la fluorescencia emitida por la MDC. La fluorescencia se expresó

como porcentaje de la actividad específica (en unidades arbitrarias) tal y como se ha descrito (Esteban *et al.*, 2007).

2.2.6. Determinación del pH lisosomal

Los fibroblastos control y los procedentes de pacientes se incubaron en medio completo con FITC-dextrano a una concentración de 0,5 mg/ml durante 24 h, se lavaron dos veces con PBS y se realizó una caza de 1 h en medio completo fresco sin FITC-dextrano. A continuación, los fibroblastos se incubaron en medio de alta o baja proteólisis (KH o KH más insulina y aminoácidos, respectivamente) durante 1 h y se cuantificó la fluorescencia. En paralelo, para poder realizar una curva de calibrado de fluorescencia a diferentes valores de pH, se incubaron fibroblastos control en los dos medios ensayados, a diferentes valores de pH (desde 4,5 hasta 7,0) en tampón acetato sódico o en MES según correspondiera. Para conseguir que el pH lisosomal alcanzase el mismo valor que el del medio, durante la última hora también se añadió nigericina y monensina a unas concentraciones de 10 y 20 μM , respectivamente. Además, y como control positivo del cambio de pH lisosomal, se añadió NH_4Cl a una concentración final de 20 mM tanto al medio de alta como al de baja proteólisis.

Antes de su observación, todas las células se lavaron tres veces con PBS frío. Para cada condición, se analizaron 200 células de forma aleatoria y se tomaron fotografías con un microscopio de fluorescencia Observer Z.1 acoplado a un sistema de seccionamiento óptico ApoTome. Se cuantificó la media de la fluorescencia, utilizando el software de Carl Zeiss, Axio Vision 4.6. La fluorescencia (longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de emisión: 519 nm) se determinó para cada célula individual después de restar la correspondiente fluorescencia basal, y se expresó en unidades relativas de fluorescencia (URF). Los valores de URF se linealizaron y se representaron frente a los correspondientes valores de pH. El pH lisosomal de las diferentes líneas de fibroblastos humanos en las distintas condiciones

de cultivo se calculó interpolando la intensidad media de fluorescencia en su recta de calibrado correspondiente.

2.2.7. Estudio de la ubiquitinación

Las células crecidas hasta confluencia en medio completo se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en medio de alta o de baja proteólisis y en ausencia o en presencia del inhibidor de proteasomas MG132 (N-benziloxycarbonilo-leucina-leucina-leucina aldehído) a una concentración final de 50 μ M durante 4 h. A continuación, se eliminó el medio de las placas y se recogieron las células en tampón RIPA con los inhibidores leupeptina 0,1 mM y PMSF 1 mM. Para obtener un lisado celular, se sometieron las células a ciclos de vórtex/hielo cada 5 min durante 30 min. Los lisados celulares obtenidos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. A partir de estos sobrenadantes, se analizó por *Western-blot* la cantidad de proteínas mono y poliubiquitinadas empleando el anticuerpo FK2.

2.2.8. Estudio de la señalización

Las células crecidas hasta confluencia en medio completo se lavaron tres veces con PBS y se incubaron en medio de alta proteólisis durante 15 min para activar la autofagia. Pasado este tiempo, a la mitad de las placas se añadieron los estímulos de insulina (concentración final 10^{-3} mg/ml) y de aminoácidos esenciales (concentración final 2x a partir de la mezcla comercial 50x) y se dejaron 30 min más en incubación. A continuación, se eliminó el medio de las placas y las células se recogieron con tampón de lisis para células de mamífero: Tris 50 mM pH 8,0, NaCl 10 mM, Nonidet P-40 al 1 % (v/v), glicerol al 20 % (v/v), añadiendo además PMSF 1 mM, leupeptina 100 μ M, EDTA 2 mM, NaF 100 mM y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM. Se hicieron 6 ciclos de congelación y descongelación (-180 °C y 37 °C, respectivamente), obteniéndose los lisados celulares. A continuación, se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y los sobrenadantes corresponden a los extractos celulares preclarificados. La fosforilación de

diferentes proteínas implicadas en las rutas de señalización se analizó por *Western-blot* en dichos extractos.

Los anticuerpos específicos para las formas fosforiladas se utilizaron en la primera inmunodetección y, tras el *stripping* de las membranas con un tampón de glicina 50 mM y SDS 10 % a pH 2,3 durante 20 min a temperatura ambiente, se utilizaron los anticuerpos para las formas totales de cada una de las proteínas analizadas.

2.2.9. Análisis de la macropinocitosis

Para estudiar la macropinocitosis se han utilizado dos aproximaciones, la microscopía de fluorescencia y la citometría de flujo. Para el estudio por microscopía de fluorescencia, los fibroblastos control y los procedentes de pacientes se incubaron en medio de alta proteólisis durante 1 h a 37 °C, tras lo cual se añadió FITC-dextrano a una concentración de 0,5 mg/ml durante 2 h. Seguidamente, las células se lavaron dos veces con PBS y se realizó una caza de 1 h en medio de alta proteólisis sin FITC-dextrano. Se fotografiaron de forma aleatoria 100 células de cada línea celular con un microscopio de fluorescencia Observer Z.1 acoplado a un sistema de seccionamiento óptico ApoTome (longitud de onda de excitación: 495 nm, longitud de onda de emisión: 519 nm).

La cuantificación mediante citometría de flujo de la endocitosis de fase fluida (macropinocitosis) se realizó esencialmente como se ha descrito anteriormente (Dowrick *et al.*, 1993). Brevemente, las células se incubaron a 37 °C con 0,5 mg/ml de FITC-dextrano durante los tiempos indicados en medio de alta proteólisis. Las células se lavaron con PBS a 4 °C, se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min y, a continuación, se recogieron y se resuspendieron en PBS frío a una concentración de 5×10^5 células por 0,5 ml. Las células obtenidas se analizaron mediante citometría de flujo a las longitudes de onda de excitación y de emisión de 495 y 519 nm, respectivamente, y se calculó el porcentaje de células positivas para el FITC-dextrano para cada condición experimental. Los datos se

presentan como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes.

2.2.10. Análisis de la endocitosis mediada por el receptor de EGF

La unión de EGF a su receptor se estudió utilizando AF488-EGF y empleando tres concentraciones diferentes. Los fibroblastos subconfluentes se incubaron en condiciones de alta proteólisis durante 1 h, se pusieron en hielo para detener la endocitosis y a continuación se añadió AF488-EGF a las concentraciones de 0,2, 2 y 10 μ g/ml durante 30 min. A continuación, se analizaron aproximadamente 5×10^5 células mediante citometría de flujo. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 495 y 519 nm, respectivamente, y se obtuvieron las medias de los valores de fluorescencia de tres experimentos diferentes con muestras por triplicado.

El estudio por citometría de flujo de la internalización del receptor de EGF se realizó básicamente tal como se ha descrito en Göstring *et al.*, 2010 y Lauer *et al.*, 2002. Los fibroblastos subconfluentes se incubaron en condiciones de alta proteólisis (para maximizar la internalización) y durante los tiempos de ensayo que se indican con AF488-EGF (200 ng/ml). La endocitosis se detuvo con PBS/BSA 0,1 % frío, manteniendo las células en hielo durante el resto del experimento para evitar la internalización. Se analizaron aproximadamente 5×10^5 células mediante citometría de flujo utilizando las mismas longitudes de onda de excitación y emisión que en el análisis de la unión del ligando. Se obtuvieron las medias de los valores de fluorescencia de tres experimentos diferentes con muestras por triplicado y los resultados se expresaron como el porcentaje de células marcadas con AF488-EGF.

Para el análisis mediante *Western-blot* de la degradación y de la fosforilación de EGFR, tras una incubación de 30 min en medio de alta proteólisis, se estimuló a las células adicionando EGF humano a una concentración final de 100 ng/ml durante diferentes tiempos entre 0 y 60 min. A continuación, las células se recogieron y se lisaron en tampón de lisis para células de mamífero a 4 °C, adicionando PMSF 1 mM, leupeptina

100 μ M, EDTA 2 mM, NaF 100 mM y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 20 mM. Los anticuerpos específicos para la forma fosforilada se utilizaron siempre primero. Después, las membranas se trataron con tampón de *stripping* (glicina 50 mM, SDS 10 % pH 2,3) durante 20 min a temperatura ambiente y se utilizaron los anticuerpos que reconocen a la EGFR total.

El análisis de la internalización y reciclaje de EGFR se realizó modificando el protocolo descrito en Gao *et al.*, 2010. Los fibroblastos confluentes se lavaron tres veces con PBS que contenía CaCl_2 0,2 mM y MgCl_2 2 mM (PBS-CaMg). A continuación, se incubaron durante 30 min a 4 °C con el reactivo de biotina (NHS-SS-Biotin) a una concentración final de 0,5 mg/ml. Las células se lavaron tres veces con PBS-CaMg frío para eliminar el exceso de biotina. La biotina se bloqueó con un lavado de glicina 100 mM/PBS durante 2 min a temperatura ambiente para realizar después tres lavados más con PBS-CaMg. Se retiró una placa por línea celular a la que se añadió tampón RIPA con inhibidores de proteasas (leupeptina 0,1 mM y PMSF 1 mM). El resto de placas se incubaron con EGF 2 ng/ml durante 30 min para favorecer la internalización del receptor. Pasado este tiempo, las placas se pusieron en hielo añadiendo glutatión reducido 50 mM en tampón TAPS, realizando dos incubaciones de 20 min a 4 °C. Tras realizar tres lavados con PBS-CaMg se retiró de nuevo una placa por línea celular y las células se lisaron tal y como se describe anteriormente. El resto de placas se incubaron con yodoacetamida 5 mg/ml en PBS-CaMg durante 5 min a 4 °C para inactivar el glutatión y se lavaron dos veces con PBS-CaMg. Se añadió EGF 2 ng/ml durante 30 min más para favorecer la internalización del receptor. A continuación, y tras tres lavados con PBS-CaMg, se retiró una placa por línea, lisando las células como se ha descrito. A las placas restantes se les añadió glutatión reducido 50 mM en tampón TAPS, realizando dos incubaciones de 20 min a 4 °C, y tres lavados con PBS-CaMg. A continuación, las células se lisaron con RIPA adicionando los inhibidores leupeptina 0,1 mM y PMSF 1 mM.

Una vez recogidas las células con tampón RIPA, se mantuvieron 30 min en hielo haciendo ciclos de hielo/vórtex cada 5 min. Los lisados se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. Los extractos preclarificados se incubaron con la resina de afinidad NeutrAvidin Agarosa (equilibrada con tres lavados de PBS-CaMg) durante 2 h a 4 °C. Las proteínas biotiniladas se analizaron por *Western-blot* con anticuerpos frente a EGFR total y, como control de carga, frente a transferrina.

2.2.11. Análisis de la endocitosis mediada por caveolas

Las células crecidas hasta subconfluencia se lavaron dos veces con PBS y se incubaron durante 30 min en condiciones de alta proteólisis. A continuación se añadió la solución de BodiPY FLC5 a una concentración final 0,5 µM durante los tiempos 0, 5, 15, 30, 45 y 90 min, La endocitosis se detuvo con PBS frío, manteniendo las células en hielo durante el resto del experimento para evitar la internalización. Se tripsinizaron durante 5 min y se añadió 1 ml de BSA 0,1 % en PBS frío. Las células recogidas se centrifugaron a 150 g durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió con 0,5 ml de BSA 0,1 % en PBS frío. A continuación las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur de BD Biosciences a las longitudes de onda de excitación y emisión de 505 y 620 nm, respectivamente.

2.2.12. Análisis del ciclo celular por citometría

Para las determinaciones del ciclo celular, se utilizaron 10⁶ fibroblastos en crecimiento exponencial. Se recogieron tanto las células de la monocapa como las que se desprenden al eliminar el medio de cultivo para no infravalorar las células en mitosis. A continuación, se fijaron con etanol al 70 % frío durante al menos 1 h a -20 °C. A continuación, se centrifugaron y se resuspendieron en una solución de yoduro de propidio (IP 50 µg/ml y RNAsa 100 µg/ml en PBS) incubándose durante toda la noche a 4 °C. Las células así tratadas se analizaron mediante citometría de flujo en un

citómetro FACSCalibur de BD Biosciences a las longitudes de onda de excitación y emisión de 535 y 617 nm, respectivamente. Los histogramas de ADN se analizaron mediante el software Cylchred para el análisis del ciclo celular (Universidad de Cardiff, Reino Unido) y se determinaron los porcentajes de células con diferente contenido en ADN.

2.2.13. Medidas del estrés oxidativo y de la actividad catalasa

Para la cuantificación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), las células se incubaron durante 1 h a 37 °C en medio de alta proteólisis. A continuación, se añadieron HE o DHR-123 (ambos, a una concentración final de 5 µM), incubándose durante 30 min a 37 °C. Tras ello, se lavaron dos veces con PBS y se recogieron las células por tripsinización, manteniéndose en sus correspondientes medios. Se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo unas 5×10^5 células por muestra. Los valores medios de fluorescencia se obtuvieron a unas longitudes de onda de excitación y de emisión de 505 y 595 nm para la HE y de 485 y de 525 nm, para la DHR-123, respectivamente.

Para determinar la actividad catalasa, los fibroblastos se crecieron hasta confluencia, se lavaron tres veces con PBS y se dejaron 3 h a 37 °C en medio de baja o de alta proteólisis. A continuación, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 100 g durante 10 min, se lavaron con PBS y al sedimento de las células se le añadió 100 µl de tampón fosfato potásico 100 mM a pH 7,0. Posteriormente, las células se sonicaron y se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. La actividad catalasa se midió en el sobrenadante como se ha descrito en García-Giménez *et al.*, 2013 y Perez-Rivero *et al.*, 2008. Esta determinación se hizo mediante una cinética de punto final, valorando la actividad peroxidasa. La reacción se compone de diversas etapas en las que se forma un intermediario de catalasa-H₂O₂ que, en presencia de metanol como donante de hidrógeno, forma agua y PFA, que finalmente reaccionará con el reactivo de Purpald y

que, tras añadir KIO_4 , dará lugar a un compuesto coloreado que absorbe a 540 nm.

De manera detallada, el proceso es el siguiente: en una placa de 96 pocillos se añadieron 100 μl de tampón de ensayo (tampón fosfato potásico 100 mM a pH 7,0), 30 μl de metanol y 20 μl de los patrones (preparados a partir de PFA 6 mM y de tampón fosfato potásico 25 mM con EDTA 1 mM y BSA 1 mg/ml) o de los extractos celulares. La reacción se inició al añadir 20 μl de H_2O_2 en todos los pocillos (debe hacerse rápidamente), se incubó a temperatura ambiente durante 20 min y se detuvo al añadir 30 μl de KOH 10 M. A continuación, se añadieron 30 μl de solución de Purpald (35 mM en HCl 0,5 M), se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y, por último, se añadieron 10 μl de KIO_4 . Las muestras se incubaron durante 70 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de placas M5/SpectraMax.

Se calculó la media de las absorbancias de las réplicas de los patrones y se obtuvo una recta de calibrado de concentraciones de PFA. Finalmente, se calculó la concentración final de PFA en las muestras, utilizando dicha recta y calculando la actividad catalasa. Para que la medida de la actividad de catalasa en esas condiciones sea reproducible, los niveles de PFA deben situarse entre los 0,25 y 4 nmoles/min/ml.

2.2.14. Estudio de la morfología mitocondrial y del potencial de membrana

Para observar la morfología mitocondrial las células se crecieron sobre cubreobjetos y se incubaron en condiciones de alta o baja proteólisis durante 2 h, añadiendo MitoTracker Red 75 nM durante los últimos 15 min a 37 °C. Pasado este tiempo, las células se fijaron con 4 % de PFA en PBS durante 10 min a temperatura ambiente y se montaron utilizando el reactivo Fluor-Save. Los fibroblastos se observaron en un microscopio confocal Leica TCS-SP2-AOBS.

Para cuantificar el potencial de membrana, las células crecidas hasta confluencia se incubaron durante 2 h en medio de alta o baja proteólisis. A continuación, se tripsinizaron y se prepararon tubos por triplicado con 10^5 células en cada una de las muestras. Se incubaron con TMRM durante 30 min en sus correspondientes y, como control positivo, se utilizó CCCP 20 μ M. Pasado este tiempo, se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCalibur de BD Biosciences a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de emisión de 590 nm.

2.2.15. Análisis del retrómero y del transporte de enzimas lisosomales

Para estudiar la estabilidad del CI-MPR y de los componentes del retrómero mediante *Western-blot*, los fibroblastos control y CLN3 confluentes se lavaron tres veces con PBS y se incubaron 30 min en medio de alta proteólisis y seguidamente se incubaron durante 6 h en medio de baja y alta proteólisis, con y sin cicloheximida (CHX) 100 μ g/ml. Para la obtención de los extractos las células se recogieron con tampón de lisis para células de mamífero. Tras diversos ciclos de congelación (a -180 °C) y descongelación (a 37 °C), los extractos se centrifugaron a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se analizaron mediante *Western-blot* con los anticuerpos anti-CI-MPR, anti-hVps35, anti-hVps26, anti-SNX1 y anti-SNX2.

Para el estudio de la colocalización entre el CI-MPR y la TGN38, los fibroblastos sembrados sobre cubreobjetos hasta subconfluencia se incubaron en condiciones de alta proteólisis durante 4 h con inhibidores lisosomales (pepstatina 1 μ M y leupeptina 100 μ M) para evitar la degradación de las enzimas transportadas. A continuación, las células se fijaron con PFA al 4 % en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Después de lavar las células tres veces con PBS, los grupos aldehído libres se inactivaron con NH_4Cl 75 mM y glicina 20 mM durante 10 min a 20 °C. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS, se permeabilizaron durante 20 min con saponina al 0,025 % en PBS, se bloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 1 h y se incubaron con el anticuerpo primario durante

1 h a 37 °C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-CI-MPR (1:100) y anti-TGN38 (1:200). A continuación, las células se lavaron cinco veces con BSA al 1 % y saponina al 0,01 % en PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con Alexa 488 durante 1 h a 37 °C. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron cuatro veces con BSA al 1 % y saponina al 0,025 % en PBS, una vez más con PBS y se montaron con FluorSave. Para el análisis de colocalización, se observaron en un microscopio de fluorescencia confocal Leica TCS-SP2-AOBS. Se analizaron al menos tres campos independientes por cubreobjeto, seleccionados de forma aleatoria y que representan un total de unas 100-150 células aproximadamente por línea celular.

2.2.16. Procedimientos generales

2.2.16.1. Obtención de extractos celulares

La concentración de proteínas se determinó utilizando el BCA Protein Assay Kit (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante o mediante el método de Lowry-deoxicolato tal y como se ha descrito anteriormente (Martín de Llano *et al.*, 2000). Los volúmenes de los extractos correspondientes a la cantidad de proteína requerida se sometieron a SDS-PAGE para la posterior inmunodetección de las proteínas de interés (ver a continuación, apartado 2. 2.16.2).

2.2.16.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS, inmunotransferencia y Western-blot

Las proteínas de las diferentes muestras se separaban mediante electroforesis en mini geles verticales (Mini-Protean II y Protean, Amersham Biosciences) de poliacrilamida-SDS, en condiciones de amperaje constante (50 mA). Los porcentajes de acrilamida que se utilizaron variaron del 8 % al 16,5 %, dependiendo de la masa molecular de la proteína a estudiar. A las muestras se les añadió un volumen de tampón de carga (2x) (Laemmli: Tris-

HCl 125 mM, glicerol 20 % (v/v), 2-mercaptoetanol 10 % (v/v), SDS 5 % y azul de bromofenol 0,2 %, pH 6,8) y se calentaban a 95 °C durante 10 min. Los geles se transferían a una membrana de PVDF durante 16-18 h a 4 °C, empleando un tanque de transferencia húmeda (Bio-Rad Laboratories) y Tris base 25 mM, glicina 192 mM, pH 8,3. Para verificar la eficacia de las transferencias, las membranas se teñían 15 min con rojo Ponceau S al 0,5 % en ácido acético al 1 % y se desteñían con TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM), sometiendo a las membranas, a continuación, a un tratamiento durante 1 h con solución bloqueante (5 % de leche desnatada en polvo en TBS).

Posteriormente, las membranas se incubaban a 4 °C durante 5 a 18 h, dependiendo del anticuerpo primario, en TBS con BSA al 2 % y azida sódica al 0,01 %. La dilución del anticuerpo era 1:1.000 en todos los casos, excepto para el anticuerpo anti-actina, en el que la dilución utilizada fue 1:5.000, y para el anti-LC3 que fue 1:500. Tras tres lavados de 5 min en agitación constante con TBS-T (TBS con Tween-20 0,05 % (v/v)), las membranas se incubaban durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado (que reconoce la IgG, que era de conejo o de ratón según hubiese sido el anticuerpo primario) conjugado a la peroxidasa (HRP), a una dilución variable entre 1:5.000 y 1:10.000. Tras tres lavados de 5 min en agitación constante con TBS-T y dos de 5 min con TBS, las proteínas se visualizaron mediante la reacción de la peroxidasa, utilizando el sustrato quimioluminiscente para *Western-blot* Lumi-Light o el ECL Prime. Las bandas de las proteínas se cuantificaron mediante su análisis densitométrico con un Image Quant ECL dentro del rango lineal de respuesta del anticuerpo.

2.2.16.3. Estadística

Los datos para las diferentes condiciones se presentan como medias \pm SD de al menos tres experimentos independientes. Los datos para los fibroblastos control y los CLN2 corresponden a los datos agrupados de las

tres líneas celulares diferentes de cada caso, puesto que no observamos diferencias significativas entre ellas. Los datos de los fibroblastos CLN3 proceden de un solo paciente (ver la sección 1.2), debido a que esta línea celular procedía de un explante y a que no había fibroblastos comercialmente disponibles de esta variante de lipofuscinosis. Por ello, utilizamos también dos líneas de linfoblastos CLN3 (junto a linfoblastos de un control) para contrastar algunos de los resultados obtenidos a partir de los fibroblastos. El análisis estadístico se realizó utilizando la versión 5.0 del software estadístico Graph Pad Prism. Las diferencias entre los pares de muestras se analizaron mediante los test-t de Student. Para comparaciones de más muestras, se utilizó el test de ANOVA de una vía, seguido por el test de Student-Newman-Keuls post hoc. La significación se ha considerado a * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$, tal como se indica en cada caso.

***RESULTADOS Y
DESARROLLO ARGUMENTAL***

3. RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL

3.1. Estudio de la degradación intracelular de proteínas en fibroblastos humanos de pacientes de LINCL y JNCL

En las situaciones en las que la célula carece de aminoácidos de origen exógeno, la degradación de las proteínas celulares supone la principal fuente de aminoácidos para la gluconeogénesis y para otras vías anabólicas importantes como la síntesis de proteínas. En ese sentido, las dos principales vías de degradación intracelular de proteínas son, como ya comentábamos en la Introducción general, el sistema ubiquitina-proteasomas (una vía no lisosomal) y la macroautofagia (una vía lisosomal). Esta última es especialmente activa en ausencia de nutrientes (Meijer & Codogno, 2004; Yoshimori, 2004).

En las lipofuscinosis ceroides neuronales, al igual que ocurre con otras enfermedades de almacenamiento lisosomal, se observa como aspecto más destacado una acumulación de material sin degradar en el interior de los lisosomas de las células de los pacientes. Este material suele tener una apariencia ultraestructural característica para cada enfermedad. Las lipofuscinosis ceroides neuronales más frecuentes son las variantes LINCL y JNCL. A pesar de las diferencias existentes en la morfología del material sin degradar, en la edad de aparición de la enfermedad y en la esperanza de vida de los afectados, un rasgo común en ambas (que se observa también en otras variantes) es una elevada proporción de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial en la composición de ese material que se acumula en los lisosomas.

Para analizar y comparar la funcionalidad de la macroautofagia y de la vía ubiquitina-proteasomas en los fibroblastos controles y procedentes de pacientes, en este trabajo se ha utilizado un medio pobre en nutrientes, el medio de Krebs-Henseleit, que solamente contiene glucosa como fuente de carbono y que al incubar las células en el mismo induce en ellas una elevada proteólisis. Alternativamente, se ha usado ese mismo medio pero

que contenía insulina y aminoácidos (ver el apartado de Metodología) para producir una proteólisis más reducida en las células. A estos medios los llamaremos a partir de ahora, respectivamente, medios de alta y baja proteólisis. Con el primero de ellos, la macroautofagia es el principal mecanismo responsable de la degradación intracelular de proteínas. En cuanto a la vía ubiquitina-proteasomas, los nutrientes o las hormonas no tienen un papel tan destacado en su regulación, como ocurre en el caso de la macroautofagia. Por eso, cuando las células se mantienen en un medio de baja proteólisis su importancia relativa aumenta a expensas de una disminución en la macroautofagia (Fuertes *et al.*, 2003b). Además, esas dos vías pueden ver modificada su actividad como consecuencia de alteraciones en cada una de ellas, al estar muy relacionadas entre sí funcionalmente (Kuang *et al.*, 2013; Park & Cuervo, 2013; Webb & Brunet, 2014).

3.1.1. Estudio de las vías lisosomales

Para tratar de identificar alteraciones comunes y/o diferentes en la degradación intracelular de proteínas en fibroblastos humanos de pacientes de LINCL y JNCL, hemos comenzado por analizar en detalle las vías lisosomales y, en particular, la macroautofagia, ya que es en estos orgánulos donde se acumula el material sin degradar. Para ello, se han comparado en esos estudios unas condiciones de alta proteólisis con otras de baja proteólisis (ver arriba), ya que la actividad macroautofágica es mucho mayor en la primera de ellas.

3.1.1.1. Morfología lisosomal mediante microscopía electrónica

En los fibroblastos humanos procedentes de pacientes de ambas variantes de lipofuscinosis ceroides neuronales se observan unos lisosomas de mayor tamaño que contienen material no degradado, pero cuya morfología difiere según cada una de las dos variantes (comparar la ultraestructura de los lisosomas en la figura 7, donde estos se han indicado mediante flechas). Así, en el caso de las células procedentes de pacientes de la variante

infantil tardía (LINCL), los lisosomas presentan un característico bandeo concéntrico, mientras que en los de la variante juvenil (JNCL) el bandeo tiene una forma que, en cierto modo, recuerda a una huella dactilar. De hecho, la morfología lisosomal se ha utilizado como método diagnóstico en las lipofuscinoses ceroides neuronales (Carlén & Englund, 2001) y todavía se sigue utilizando para confirmar el diagnóstico por otros procedimientos.



Figura 7. Morfología lisosomal característica en fibroblastos control y procedentes de pacientes de lipofuscinoses ceroides neuronales infantil tardía y juvenil. Micrografías electrónicas representativas de fibroblastos control, CLN2 y CLN3 incubados en un medio de alta proteólisis. Se observa el aumento del tamaño lisosomal en CLN2 y CLN3. En el contenido lisosomal es característico el patrón de líneas circulares concéntricas en la LINCL (CLN2) y en forma de huella dactilar en la JNCL (CLN3). Estas morfologías no se observan en los fibroblastos control. Las flechas indican un lisosoma típico en cada célula. Barra = 500 nm.

Por tanto, la morfología observada en los lisosomas procedentes de los fibroblastos de ambos grupos de pacientes coincide en cada caso con la descrita para las dos variantes de lipofuscinoses ceroides neuronales que estudiamos aquí (Anderson *et al.*, 2013). Además, las alteraciones lisosomales observadas, en particular la elevada acumulación de material no degradado en su interior, indican también que la función degradativa lisosomal podría estar alterada.

3.1.1.2. Análisis de la actividad de la enzima TPP1

En la variante LINCL, el gen afectado es *CLN2*, que codifica la enzima lisosomal TPP1 (ver Introducción general). Para confirmar que las células CLN2 (LINCL), a diferencia de las células control y de las CLN3 (JNCL), carecían de esta actividad, se realizó un ensayo enzimático *in vitro* con

extractos celulares preclarificados obtenidos a partir de células incubadas en medio de alta o baja proteólisis. Para ello se utilizó un procedimiento estándar (Vines & Warburton, 1999) con un sustrato fluorescente e inhibiendo el resto de actividades proteolíticas con leupeptina 0,1 mM para inhibir algunas serina y cisteína proteasas, lactacistina 10 μ M para inhibir proteasomas, PMSF 1 mM para inhibir la inmensa mayoría de las serina proteasas, pepstatina A 1 μ M para inhibir muchas aspártico proteasas y EDTA 5 mM para inhibir las metalo-proteasas y otras proteasas activadas por metales.

La actividad de la enzima en los fibroblastos control (y también en los fibroblastos CLN3) era mayor en condiciones de alta proteólisis, lo que hace pensar que sus niveles celulares son limitantes y requieren un incremento al aumentar la entrada de material para degradarse en los lisosomas para poder ejercer adecuadamente su función. En cualquier caso, en los fibroblastos CLN2 se obtuvo el resultado esperado en las dos condiciones estudiadas, es decir una ausencia prácticamente total de actividad de TPP1. Sin embargo, en los extractos de los fibroblastos CLN3, la actividad *in vitro* de esta enzima a pH óptimo estaba aumentada de forma significativa, y este aumento era de un 15 % aproximadamente en ambas condiciones en comparación con los fibroblastos control (figura 8). Esto sugiere un intento de estas células por compensar el defecto en su propia función lisosomal, aumentando los niveles de TPP1, por lo que parece que las funciones de Cln3p y TPP1 están relacionadas de alguna manera. Puesto que no se dispone de anticuerpos que reconozcan a Cln3p y tampoco se conoce su función, no se ha podido verificar si se producen cambios similares en esta proteína. Sin embargo y en este sentido, conviene tener en cuenta que la composición del material acumulado en los lisosomas de pacientes con LINCL (fibroblastos CLN2) y JNCL (fibroblastos CLN3) es muy parecida (Junaid & Pullarkat, 2001).

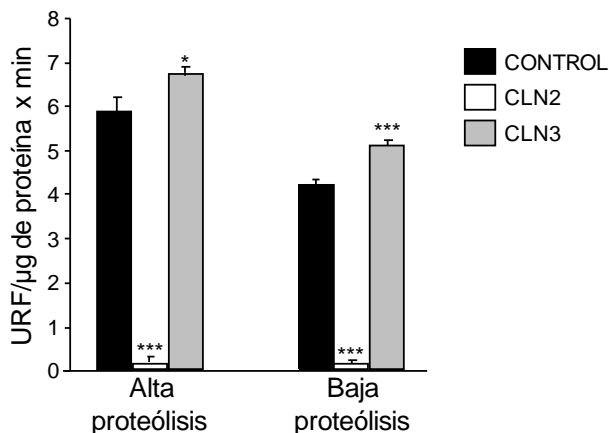


Figura 8. Medidas de la actividad enzimática *in vitro* de la TPP1. En el histograma se muestran los resultados para los fibroblastos control, CLN2 y CLN3. Tal y como se indica, los fibroblastos se incubaron en un medio de alta o baja proteólisis y se determinó la actividad de la enzima TPP1 y la proteína total, tal como se describe en el apartado de Metodología. Los resultados se expresan en unidades relativas de fluorescencia (URF) por μg y por min de proteína total, y representan la media y desviación típica de tres experimentos por separado con muestras por triplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores control (* $p < 0,05$ y *** $p < 0,005$). La actividad de TPP1 era significativamente ($p < 0,005$) mayor en condiciones de alta proteólisis respecto a esa actividad en condiciones de baja proteólisis tanto en fibroblastos control como en CLN3.

3.1.1.3. Estudio de la contribución relativa de los lisosomas en general y de la macroautofagia en particular a la degradación intracelular de proteínas

Cuando se analiza la degradación intracelular de proteínas en experimentos de «pulso» y «caza», la cinética obtenida puede siempre descomponerse en dos cinéticas de primer orden, separadas por una clara discontinuidad, y que corresponden a la degradación de proteínas de vida media corta y larga. Las primeras representan solamente alrededor de un 1 % del total de proteínas celulares, pero por su elevado recambio contribuyen en un porcentaje mucho más elevado (alrededor del 30 %) al conjunto de la degradación intracelular de proteínas (Fuentes *et al.*, 2003a). Puesto que los fibroblastos procedentes de ambos pacientes presentan una elevada acumulación de material no degradado en el interior de los lisosomas, es posible que las actividades de las diferentes vías degradativas lisosomales estén alteradas. Mediante experimentos de «pulso» y «caza», se comenzó por analizar la degradación de las proteínas de vida media corta y de vida media larga en condiciones de alta o baja proteólisis,

ya que en cada una de ellas actúa preferentemente una de las vías degradativas que operan en la célula (Fuentes *et al.*, 2003a y b). Como se describe en el apartado de Metodología, las proteínas se marcaron con valina tritiada durante un «pulso», corto o largo, y se realizaron «cazas» inmediatamente después, es decir a tiempo cero (para las proteínas de vida media corta) o tras 24 h (para las proteínas de vida media larga) en el medio de crecimiento de fibroblastos que contenía un exceso (10 mM) de L-valina. Cuando, a continuación, se analizó la degradación de proteínas de vida media corta (figura 9A) y larga (figura 9B) en un medio de alta o de baja proteólisis, únicamente se observaron cambios significativos entre los fibroblastos control y los procedentes de pacientes en una de las cuatro condiciones: la correspondiente a la degradación de proteínas de vida media larga en un medio de alta proteólisis. En estas condiciones en las que la vía macroautofágica es especialmente activa, la degradación total de las proteínas se encuentra disminuida entre un 20 y un 25 %, tanto en los fibroblastos CLN2 como en los CLN3 (figura 9). En las otras tres condiciones, la principal vía de degradación de las proteínas que opera en fibroblastos humanos es la proteasomal y la actividad macroautofágica es prácticamente nula o, al menos, comparativamente mucho más reducida (Fuentes *et al.*, 2003a y b). Esto sugiere que la disminución observada en la degradación intracelular de proteínas en las células de pacientes de ambas formas de lipofuscinosis ceroides neuronales se debe principalmente, si no exclusivamente, a una reducción en la macroautofagia.

Para establecer con más precisión la vía o las vías proteolíticas que estaba/n alterada/s en esas dos variantes de lipofuscinosis ceroides neuronales se emplearon los procedimientos descritos por nosotros anteriormente (Fuentes *et al.*, 2003b). En ellos calculamos la contribución de la vía lisosomal (utilizando NH_4Cl 20 mM y leupeptina 0,1 mM), y dentro de ella, de la específica para la macroautofagia (con 3-metiladenina 10 mM). Estos estudios se realizaron en la única condición en la que se habían observado alteraciones, es decir analizando la degradación de proteínas de vida media larga en células incubadas en un medio de alta proteólisis. En las restantes condiciones no se encontraron grandes diferencias (datos no mostrados).

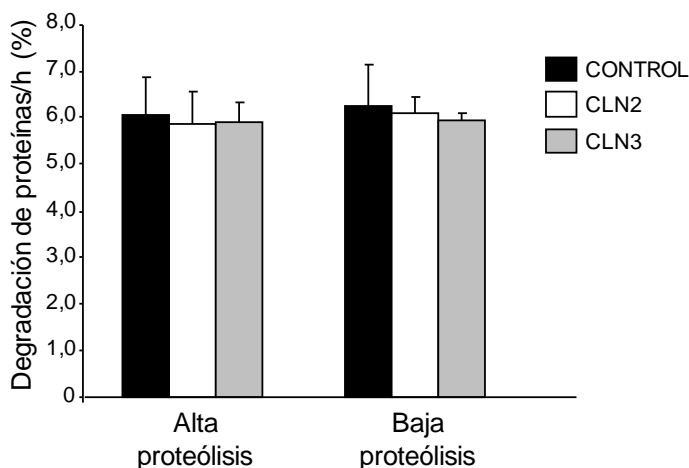
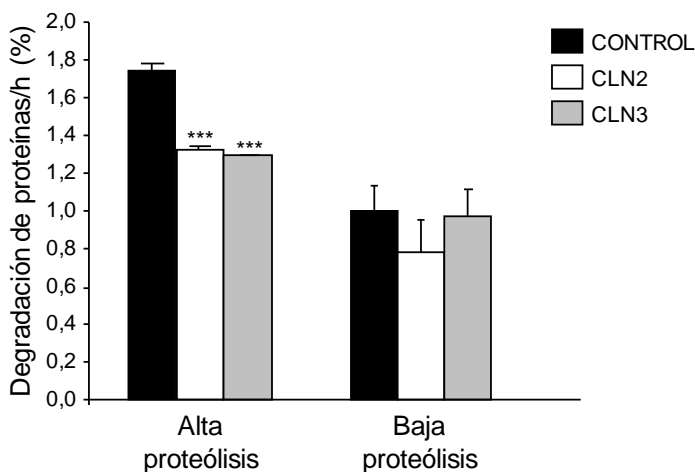
A) Proteínas de vida media corta**B) Proteínas de vida media larga**

Figura 9. Cuantificación de la degradación intracelular de proteínas. Tal y como se describe en el apartado de Metodología, se determinó mediante experimentos de «pulso» y «caza» la degradación intracelular de las proteínas de vida media corta (A) y de las de vida media larga (B) en condiciones de alta o baja proteólisis en los fibroblastos control, CLN2 y CLN3. Los resultados se presentan como el porcentaje de la proteína marcada que se degrada por h y corresponden a la media y a la desviación típica calculada a partir de doce a quince experimentos independientes con muestras por duplicado. Solamente se encontraron diferencias significativas entre los fibroblastos de pacientes y los controles al analizar la degradación de las proteínas de vida media larga en condiciones de alta proteólisis, que es cuando la macroautofagia es más activa. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores control en cada condición (***) $p < 0,005$.

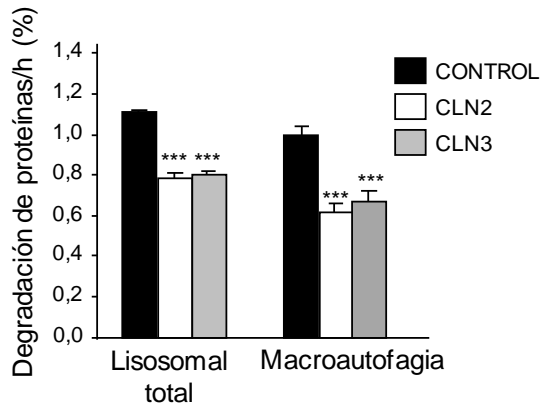


Figura 10. Participación de las vías lisosomales en la degradación intracelular de proteínas de vida media larga en un medio de alta proteólisis. Tal y como se describe en el apartado de Metodología, en los experimentos de «pulso» y «caza» se marcaron los fibroblastos humanos con valina tritiada y se determinó la contribución de las vías lisosomales (total y macroautofágica) a la degradación intracelular de proteínas en condiciones de alta proteólisis como se indica en el texto. Los resultados se presentan como el porcentaje de las proteínas marcadas que se degradan por hora, y corresponden a la media y la desviación típica de ocho a quince experimentos independientes con muestras por duplicado. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los correspondientes valores control (***) $p < 0,005$.

Los resultados obtenidos permiten concluir que la degradación lisosomal, que incluye a la macroautofagia y a otras vías proteolíticas lisosomales (como la microautofagia y la autofagia mediada por chaperonas) (Knecht *et al.*, 2009), parece explicar las diferencias observadas en el conjunto de la degradación intracelular de proteínas. De todas estas vías, parece que la macroautofagia es la vía lisosomal específicamente alterada, como se comprueba cuando estudiamos la degradación de proteínas sensible a la 3-metiladenina (figura 10), que se ha visto que es un método apropiado para calcular la contribución de la macroautofagia a la degradación intracelular de proteínas (Fuertes *et al.*, 2003b). Así pues, tanto en los fibroblastos CLN2 como en los CLN3, se observa un descenso (de alrededor de un 25 %) en la degradación de proteínas de vida media larga a través de la macroautofagia. Ese descenso corresponde bastante bien con el observado para la degradación lisosomal total. Por tanto, la vía macroautofágica se presenta como la principal vía lisosomal de degradación intracelular de proteínas que está alterada en estas células. Aunque en condiciones

basales no parece que vaya a plantear un problema importante para el normal funcionamiento de las células, si lo hará cuando se requiera, en determinadas situaciones, que la macroautofagia funcione con su máxima eficacia.

3.1.1.4. Estudio de la formación y maduración de los autofagosomas

Para que ocurra la degradación de las proteínas y de otros componentes celulares por macroautofagia es necesario, primero que se formen los autofagosomas que secuestran el material que va a degradarse y, después, que los autofagosomas, sin capacidad degradativa todavía, maduren hasta autolisosomas por fusión con endosomas y lisosomas, que proporcionan las condiciones y las hidrolasas necesarias para esa degradación (Klionsky & Codogno, 2013; Ravikumar *et al.*, 2009; Yang & Klionsky, 2010). Para analizar estas dos fases de la macroautofagia y detectar en cuál de ellas se encuentra alterado este proceso en los modelos de la enfermedad, utilizamos la proteína LC3-II. Esta proteína se encuentra específicamente en la membrana de los fagóforos y de los autofagosomas y no se encuentra en ninguna otra membrana, ni en membranas de vacuolas autofágicas en etapas avanzadas de la macroautofagia (autolisosomas), ni tampoco en las de los endosomas o de los lisosomas procedentes de otras vías.

Actualmente, la proteína LC3 se considera como el principal marcador para medir la macroautofagia (Bampton *et al.*, 2005; Kuma *et al.*, 2007; Tanida *et al.*, 2004). Tras la síntesis de la pro-LC3-I, se producen sucesiva y postraduccionalmente dos formas de LC3: la I y la II. La forma I es una proteína citosólica frecuentemente asociada a los microtúbulos y la forma II se encuentra, como hemos dicho antes, unida a la membrana de los autofagosomas. Para ello, durante la formación de los autofagosomas, la proteína LC3-I es lipídada, generalmente por unión covalente a la fosfatidiletanolamina, formándose LC3-II (Tanida *et al.*, 2005). En condiciones de privación de nutrientes, LC3-II se considera un marcador de la macroautofagia, puesto que, como hemos mencionado arriba, se asocia a las membranas preautofagosomal y autofagosomal y, además, cuando los

autofosomas pasan a autolisosomas, se degrada gracias a la acción de las proteasas lisosomales. Por eso, su presencia es específica de las etapas iniciales de la macroautofagia (Mizushima *et al.*, 2004).

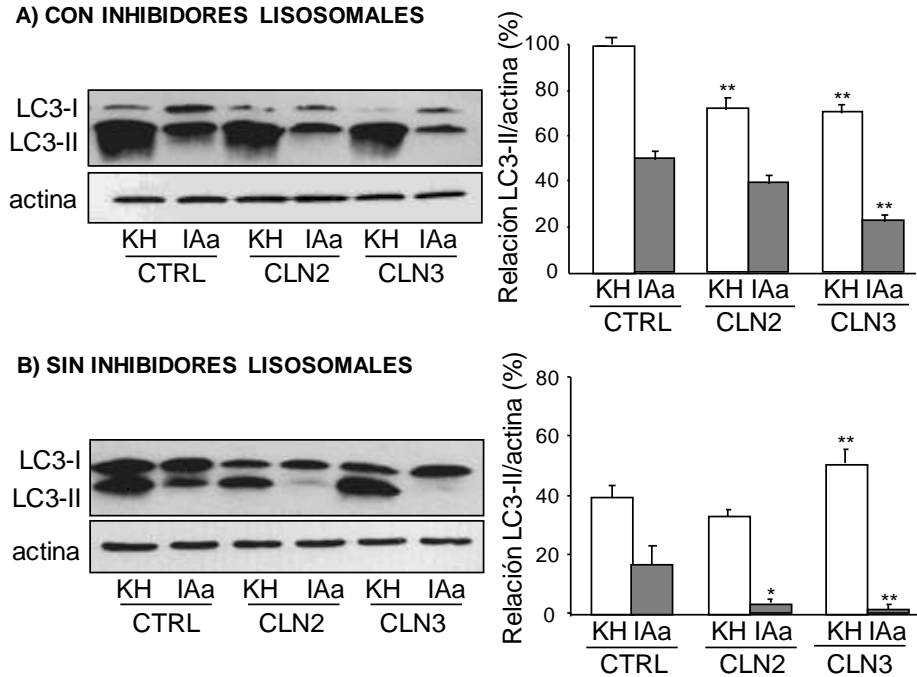


Figura 11. La formación de los autofosomas se encuentra reducida en los fibroblastos CLN2 y CLN3 y en estos últimos también se encuentra retrasada la maduración de los autofosomas. Se analizaron mediante *Western-blot* los extractos totales procedentes de fibroblastos control (CTRL), CLN2 y CLN3 incubados en medio de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis, así como con (A) o sin (B) inhibidores lisosomales (ver el apartado de Metodología), utilizando anticuerpos frente a LC3 y, como control de carga, frente a actina. La posición de las bandas de LC3-I y LC3-II se indica en la parte izquierda de la imagen de los geles. Los histogramas representan la media de tres experimentos diferentes y los resultados se muestran como la relación LC3-II/actina expresada en porcentaje relativo respecto a los valores control con inhibidores lisosomales en condiciones de alta proteólisis (A). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores control correspondientes a cada condición (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Al igual que cuando estudiábamos la degradación intracelular de proteínas en los experimentos de «pulso» y «caza» (ver apartado 1.1.3), aquí también hemos estudiado los niveles de LC3-II en condiciones de alta o baja proteólisis, y con o sin inhibidores de las proteasas lisosomales (figura 11A y 11B, respectivamente). Esto lo hicimos mediante *Western-blot* y utilizando

un anticuerpo frente a LC3 que reconoce ambas formas (la I y la II) de la proteína (ver el apartado de Metodología). En presencia de los inhibidores de las proteasas lisosomales, la cantidad de LC3-II está relacionada directamente con la cantidad de vacuolas autofágicas que se están formando y acumulando, puesto que se bloquea su degradación por los lisosomas. En cambio, sin estos inhibidores se mantiene el equilibrio existente entre la formación y la maduración de estas vacuolas autofágicas, por lo que sus niveles corresponden a los del estado estacionario. Un aumento en los mismos puede deberse tanto a un incremento en la formación de autofagosomas como a un retraso en su maduración hasta autolisosomas (o a ambas cosas a la vez).

Como era de esperar, se observa que la insulina y los aminoácidos, al inhibir la macroautofagia, reducen también los niveles de LC3-II y, por tanto, la formación de las vacuolas autofágicas. Esto ocurre en todas las líneas celulares y tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores de los lisosomas. Sin embargo, a pesar de que el patrón de respuesta a estos estímulos es similar, existen variaciones en los niveles del marcador entre las células control y las procedentes de pacientes.

Los resultados en presencia de inhibidores lisosomales (figura 11A) y en condiciones de alta proteólisis muestran una reducción en los niveles de LC3-II en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con sus controles. Además, esa disminución también se observa en CLN2 en condiciones de baja proteólisis, aunque de manera menos evidente. Por tanto, existe una alteración en la formación de los autofagosomas en ambas líneas celulares procedentes de pacientes. En cambio, y sorprendentemente, en ausencia de inhibidores lisosomales (figura 11B) los niveles de LC3-II se encuentran aumentados en los fibroblastos CLN3 en medio de alta proteólisis. Esto indicaría que en estas células, y comparativamente con los fibroblastos CLN2 o con los controles, se produce un retraso en la maduración de los autofagosomas, es decir en el paso del autofagosoma al autolisosoma, cuando se requiere una elevada actividad de la macroautofagia. Puesto que

esto requiere la llegada de enzimas lisosomales a través de la fusión del autofosoma con un endosoma/lisosoma, el aumento en los niveles de LC3-II podría deberse a una alteración de los procesos de fusión de los autofosomas con estos. Otros autores (Cao *et al.*, 2011) han descrito lo que parece ser un retraso en la maduración de los autofosomas hasta los autolisosomas en las células hepáticas obtenidas de un modelo murino de JNCL con la delección genómica de 1,02 kb en el gen *CLN3*. En ese trabajo mostraron que los autofosomas, pero no los autolisosomas, acumulaban grandes cantidades de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial. Por tanto, parece que en *CLN3*, pero no en *CLN2*, además de un retraso en la formación de las vacuolas autofágicas, hay un retraso en la maduración de las mismas.

Hay que señalar también que en todos estos experimentos los niveles de LC3-I en los fibroblastos *CLN2* y *CLN3* se vieron ligeramente, pero de forma constante, reducidos en comparación con los fibroblastos control (ver banda superior en los *Western-blot*). Puesto que LC3-I se procesa a LC3-II, esta reducción podría contribuir al descenso observado en la macroautofagia en los fibroblastos de lipofuscinosis ceroidea neuronal. Sin embargo, el significado de diferencias en los niveles de LC3-I en diferentes tipos celulares y condiciones no está completamente esclarecido, debido a que la detección de esta proteína presenta varios problemas. Así, LC3-I es menos estable, menos inmunorreactiva y más sensible a la congelación y descongelación y a la degradación en el tampón de muestras con SDS de lo que lo es la proteína LC3-II. Asimismo, su detección depende de manera importante de los anticuerpos primarios que se utilicen (e incluso del lote de los mismos) y del tipo celular y tratamiento. Por ello, aunque inicialmente en los estudios de la macroautofagia los niveles de LC3-II se referían a los de LC3-I, desde hace algunos años se ha acordado referir los niveles de LC3-II a una proteína *house-keeping*, generalmente actina o β -tubulina (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012).

Estos resultados fueron coherentes con los datos obtenidos en los experimentos de microscopía de fluorescencia con el marcador de vacuolas autofágicas EGFP-LC3 (figura 12) y que se realizaron en paralelo. En condiciones de alta proteólisis se observa una marcada reducción en el número de vacuolas autofágicas en las células procedentes de pacientes, ya que el número de puntos fluorescentes disminuyó en CLN2 (70 ± 15) y en CLN3 (77 ± 18) en comparación con los fibroblastos control (152 ± 20). Estos datos y los anteriores corresponden a la media y desviación estándar del recuento de puntos por célula, realizado en 50 células de cada tipo procedentes de tres experimentos diferentes.

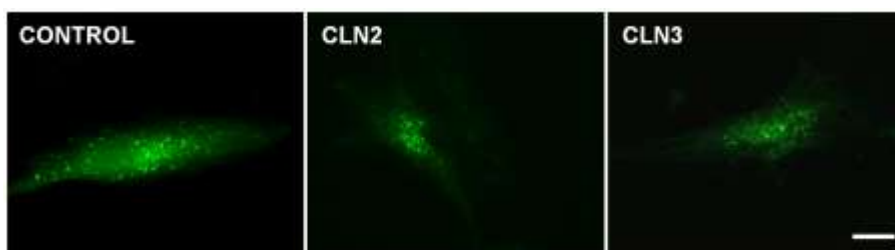


Figura 12. El número de vacuolas autofágicas observado mediante microscopía de fluorescencia es menor en los fibroblastos CLN2 y CLN3 que en los de las células control. Micrografías representativas de la superexpresión de EGFP-LC3 en fibroblastos control, CLN2 y CLN3 incubados en un medio de alta proteólisis durante 2 h a 37 °C y 48 h después de la transfección con el plásmido. Los puntos fluorescentes indican las vacuolas autofágicas. Barra: 20 μ m.

Un descenso en el flujo autofágico desde autofosomas a autolisosomas debe producir una disminución en la masa lisosomal. Para verificar esto hemos utilizado la proteína de membrana lisosomal LAMP1, cuyos niveles proporcionan una idea de la masa lisosomal. La figura 13 muestra un descenso de la fluorescencia asociada a LAMP1 tanto en los fibroblastos CLN2 como en los CLN3, confirmando el descenso en el flujo macroautofágico observado con LC3-II.

Experimentos similares a los de LAMP-1 se realizaron con monodansilcaderiverina (MDC). Este fluoróforo se acumula en los orgánulos ácidos como los lisosomas (Vázquez & Colombo, 2009), por lo que también sería indicativo de la masa lisosomal. Una vez más, se observó una

disminución de la fluorescencia en los fibroblastos procedentes de pacientes en ambas condiciones ensayadas (figura 14). Puesto que varios autores han considerado que la MDC no es un marcador específico de vacuolas autofágicas (Klionsky *et al.*, 2008; Klionsky *et al.*, 2012), se comprobó el efecto del inhibidor de la formación de vacuolas autofágicas 3-metiladenina (3-MA) sobre esa fluorescencia (ver las dos imágenes superiores en la figura 14). Este tratamiento disminuyó claramente los niveles de fluorescencia con MDC, por lo que, al menos en nuestro sistema experimental, estos niveles serían indicativos de la actividad macroautofágica. Por tanto, los experimentos con este fluoróforo indican una vez más que en las líneas de pacientes de lipofuscinosis ceroida neuronal la actividad autofágica está disminuida.

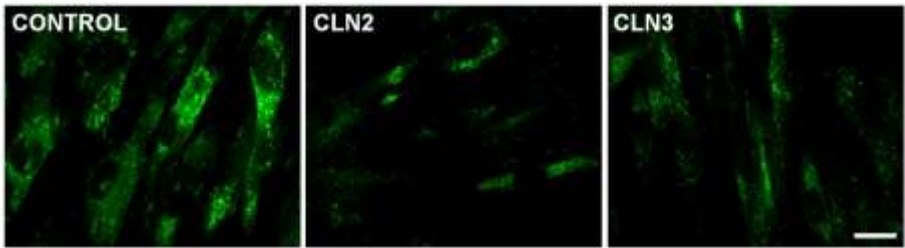


Figura 13. La masa lisosomal observada mediante microscopía de inmunofluorescencia con un anticuerpo que reconoce a la proteína de membrana lisosomal LAMP-1 es menor en los fibroblastos CLN2 y CLN3 que en los de las células control. Micrografías representativas de la inmunocitoquímica con anti-LAMP1 de fibroblastos control, CLN2 y CLN3 incubados en medio de alta proteólisis durante 2 h a 37 °C. Barra: 20 μ m.

Como resumen de todos los experimentos de este apartado podemos decir que hay un descenso en los niveles de vacuolas autofágicas y como consecuencia de eso, de lisosomas, en las líneas celulares procedentes de pacientes CLN2 y CLN3 con respecto a las células control. Este descenso se debe a un defecto en la formación de los autofagosomas en CLN2 y CLN3 y también a un defecto en la fusión de los autofagosomas con los lisosomas en CLN3.

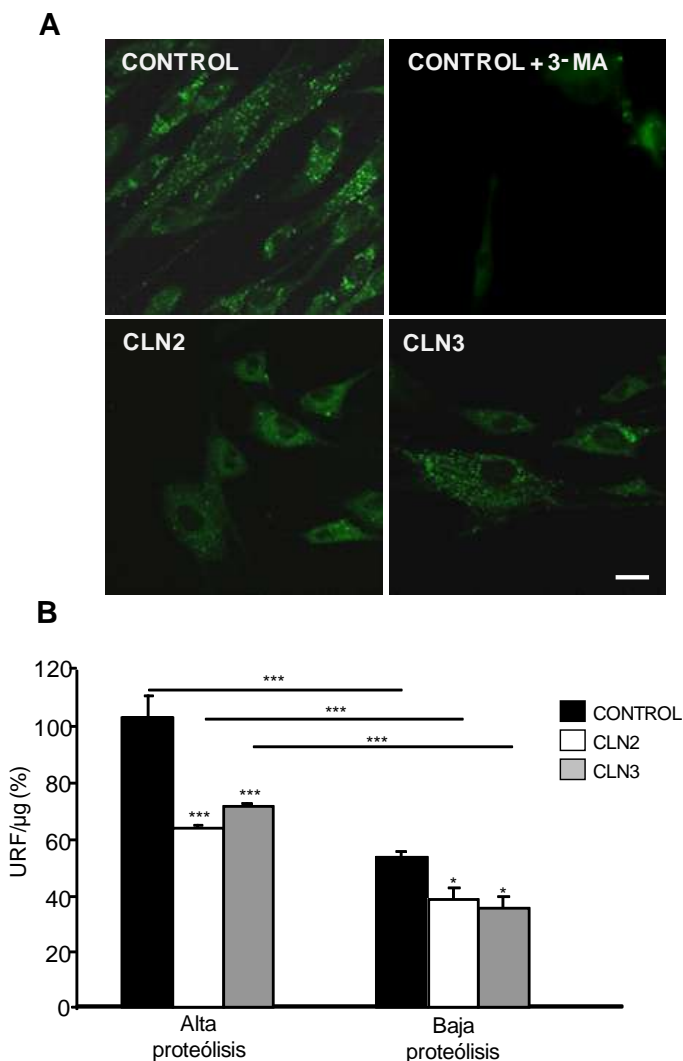


Figura 14. La fluorescencia de la monodansilcadaverina (MDC) muestra un descenso en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con las células control. A) Micrografías representativas de fibroblastos control, CLN2 y CLN3 después de 2 h en medio de alta proteólisis e incubados con MDC (ver el apartado de Metodología). La imagen de arriba a la derecha muestra el efecto sobre la fluorescencia de la MDC tras un tratamiento de las células control con el inhibidor de macroautofagia 3-MA. Como se puede ver, este tratamiento disminuye drásticamente el marcado fluorescente con MDC (comparar con las células a la izquierda), apoyando la utilidad de este marcador para mostrar cambios en la actividad macroautofágica. Barra: 20 μm. **B)** Cuantificación de la fluorescencia en condiciones de alta o baja proteólisis en los fibroblastos control, CLN2 y CLN3. Los resultados (URF por μg de proteína) se expresan en porcentaje respecto a las células control en condiciones de alta proteólisis. Los asteriscos encima de las barras indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores control correspondientes y los asteriscos sobre las rectas indican las diferencias estadísticamente significativas en ambas condiciones entre los mismos tipos celulares (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

3.1.1.5. pH lisosomal

La macroautofagia no solo requiere la formación de vacuolas autofágicas sino también la correcta degradación del material encerrado en las mismas. Para que ocurra esto último es necesaria, como se ha dicho, la fusión de los autofagosomas con los endosomas y lisosomas. Esto produce tanto la adquisición de hidrolasas lisosomales como la progresiva acidificación del lumen lisosomal, cuyo pH finalmente alcanza un valor de aproximadamente 4,7 o 4,8 en la mayoría de las células (Futerman & van Meer, 2004). El pH ácido de los lisosomas no solo es esencial para la actividad degradativa de las enzimas lisosomales (se trata de hidrolasas cuyo pH óptimo de actuación es ácido) sino que también es de vital importancia en los procesos de fusión lisosomal. De hecho, un aumento en el pH lisosomal, además de reducir la capacidad degradativa de estos orgánulos, bloquea la maduración de los autofagosomas y, como también se ha visto, de los endosomas (Ramachandran *et al.*, 2009).

Puesto que los niveles de LC3-II observados en ausencia de inhibidores de la proteólisis lisosomal en las células CLN3 procedentes de los pacientes de lipofuscinosis ceroida neuronal sugerían que en esas células se producen alteraciones en la fusión de los autofagosomas con los endosomas y lisosomas, esto podía deberse a modificaciones en el pH lisosomal de esas células. De hecho, y aunque sigue siendo un tema controvertido, algunos autores habían sugerido ya un papel de Cln3p en el control del pH lisosomal, a partir de los resultados obtenidos con su proteína ortóloga en levadura Btn1p (Golabek *et al.*, 2000; Holopainen *et al.*, 2001; Pearce *et al.*, 1999).

Para determinar el pH lisosomal en los fibroblastos control y en los CLN2 y CLN3, las células se incubaron con el complejo FITC-dextrano y en medio de baja o alta proteólisis (ver el apartado de Metodología). Al mismo tiempo, utilizando también el complejo FITC-dextrano, se obtuvieron las rectas de calibrado en condiciones de baja o alta proteólisis para valores de pH lisosomal entre 4,5 y 7,0 (figura 15).

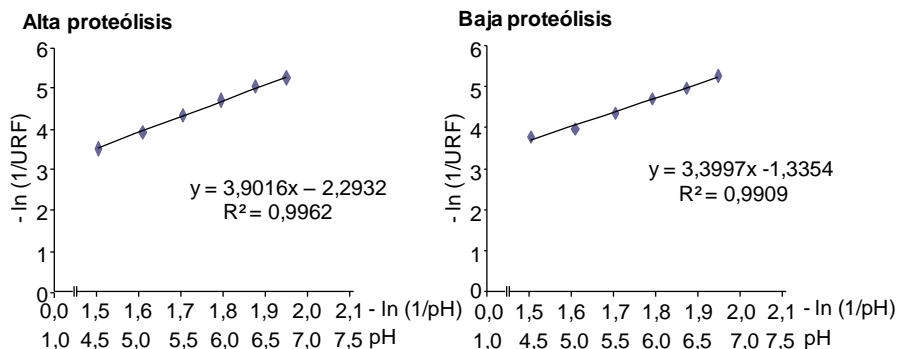


Figura 15. Rectas de calibrado realizadas en fibroblastos control incubados a pH entre 4,5 y 7,0 en medio de alta o baja proteólisis. Los fibroblastos en crecimiento exponencial se incubaron con FITC-dextrano tal y como se explica en el apartado de Metodología. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio invertido y la fluorescencia (URF) de cada célula y para cada pH se midió como se describe en el apartado de Metodología. Los datos para cada valor de pH proceden de alrededor de 200 imágenes aleatorias y las rectas de calibrado se ajustaron por mínimos cuadrados. En la figura se muestran también las correspondientes ecuaciones de regresión con sus coeficientes de correlación. En el eje de abcisas se indican las equivalencias entre los pH utilizados y sus correspondientes valores linealizados.

La figura 16 muestra ejemplos de imágenes de fluorescencia representativas de células control y CLN3 a distintos valores de pH que se utilizaron tanto para obtener las rectas de calibrado (ver figura 15) como para calcular los valores de pH lisosomal (ver tabla 2).

Tabla 2: Valores de pH lisosomal de los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 cultivados en medio de alta o baja proteólisis

	Alta proteólisis		Baja proteólisis	
	URF	pH	URF	pH
CONTROL	78,1 ± 11,7	5,5 ± 0,2	54,1 ± 8,5	4,8 ± 0,2
CLN2	67,6 ± 10,3	5,3 ± 0,2	50,6 ± 12,1	4,7 ± 0,3
CLN3	117,0 ± 15,2	6,1 ± 0,2**	86,5 ± 10,9	5,5 ± 0,2**

Los valores medios de fluorescencia para cada tipo celular y condición se calcularon a partir de los datos de tres experimentos por separado con muestras por duplicado. Esos valores se interpolaron en las correspondientes rectas de calibración (ver figura 15). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas en el pH calculado respecto a los valores control en cada condición (**p<0,01).

Los resultados de los valores medios de fluorescencia obtenidos en condiciones de alta o baja proteólisis para las diferentes células y los pH calculados a partir de la interpolación de esos valores en las correspondientes rectas de calibrado (ver figura 15) se muestran en la tabla 2.

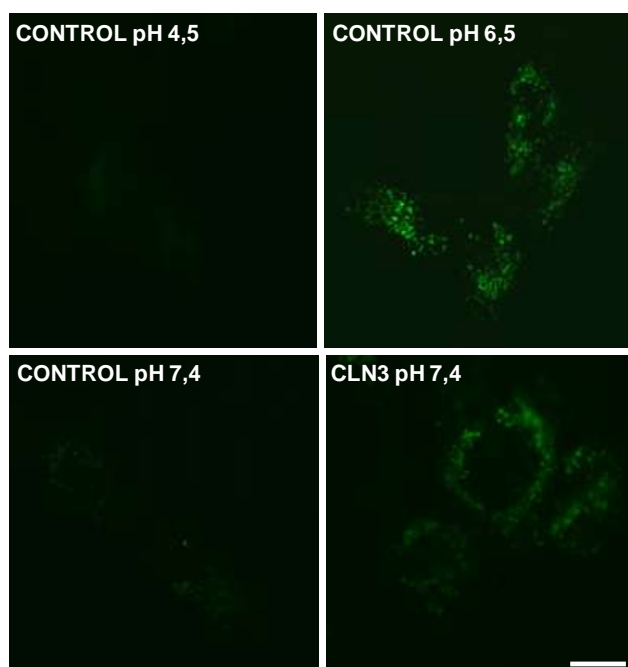


Figura 16. Los lisosomas procedentes de fibroblastos CLN3 tienen un pH mayor. Fibroblastos control, CLN2 y CLN3 en crecimiento exponencial se incubaron con FITC-dextrano tal y como se describe en el apartado de Metodología y se observaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio invertido. Los paneles superiores muestran imágenes representativas de fibroblastos control permeabilizados como se describe en el apartado de Metodología e incubados en medios de alta proteólisis a pH 4,5 (imagen izquierda) y 6,5 (imagen derecha), que se emplearon, junto con otros, para calcular las rectas de regresión de la figura 15. En los paneles inferiores se muestran fibroblastos control (imagen izquierda) y CLN3 (imagen derecha) no permeabilizados e incubados también en medio de alta proteólisis (pH 7,4). La cuantificación de la fluorescencia de estas imágenes, junto con otras, se empleó para calcular los pH lisosomales de la tabla 2. Barra: 20 μm .

Se obtuvieron unos valores de pH lisosomal similares en los fibroblastos control y los CLN2, tanto en condiciones de alta (pH de 5,5 y 5,3, respectivamente) como de baja (pH de 4,8 y 4,7, respectivamente) proteólisis. Sin embargo, los fibroblastos de la variante juvenil de

lipofuscinosis ceroidea neuronal (CLN3) presentan un pH lisosomal significativamente mayor frente a los controles: 6,1 cuando las células se incubaban en medio de alta proteólisis y 5,5 cuando lo hacían en el de baja proteólisis (ver tabla 2). Es decir, en la variante juvenil se observa un incremento del pH lisosomal de más de 0,5 unidades en ambas condiciones. Como una observación adicional cabe señalar que, en todos los casos, los valores de pH eran mayores en las condiciones de alta que en las de baja proteólisis. Esto tal vez esté reflejando la mayor captación de material citosólico (que se encuentra a un pH neutro) por macroautofagia en esas condiciones, lo que contribuiría a incrementar el pH de los lisosomas. Por tanto, estos resultados apoyan los obtenidos con el marcador de macroautofagia LC3-II en los fibroblastos CLN3 y parecen indicar que la maduración de los autofagosomas en esta línea celular se encuentra afectada por un aumento del pH lisosomal.

Este aumento en los valores del pH lisosomal que se observa en CLN3 repercutirá sobre la actividad de las enzimas hidrolíticas lisosomales, especialmente la de aquellas cuyo pH óptimo es muy ácido. Una de estas es la enzima TPP1, cuya actividad se encuentra prácticamente ausente en la variante LINCL y que tiene un pH óptimo en el rango de aproximadamente 4,0-4,5 frente a los habituales de 6,0-6,5 en otras proteasas lisosomales (en su mayoría cisteína-proteasas, como las catepsinas B, H, L S y K). Por tanto, nos planteamos investigar la actividad de esta enzima a diferentes valores de pH, desde 3,5 hasta 6,5, para abarcar los valores de pH obtenidos en el ensayo de determinación del pH lisosomal.

Los resultados de la figura 17 muestran que la actividad de TPP1 se ve especialmente disminuida (alrededor de un 60 %) al pH en el que se encuentran los lisosomas de los fibroblastos CLN3 incubados en un medio de alta proteólisis ($6,1 \pm 0,2$). Por tanto, aunque en los extractos de fibroblastos CLN3 la actividad de TPP1 se haya visto ligeramente aumentada al pH óptimo de la enzima (ver figura 8), su actividad al pH de

los lisosomas de las células procedentes de estos pacientes (ver tabla 2) se encuentra reducida de forma significativa.

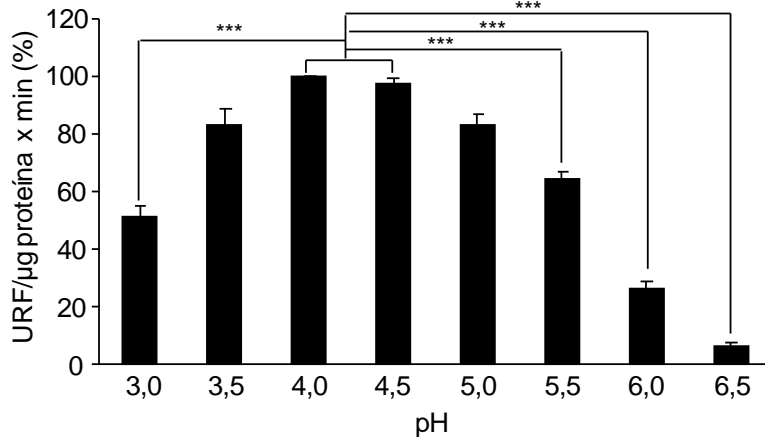


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad de TPP1. Los fibroblastos control se incubaron en condiciones de alta proteólisis y se determinó la actividad de TPP1 a diferentes valores de pH utilizando AAF-AMC. Las medidas de la fluorescencia producida por la AMC escindida y la cuantificación de las proteínas se llevaron a cabo tal y como se describe en el apartado de Metodología. Los valores de URFL μg de proteína y por min, que representan la media y la desviación típica a partir de tres experimentos por separado con muestras por triplicado, se expresan como porcentaje de la actividad máxima (a pH 4,0). Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas en comparación con los valores a pH 4,0 y 4,5 (**p<0,01; ***p<0,005).

Obviamente, es de esperar que este incremento del pH lisosomal en los fibroblastos CLN3 no solo afecte a la actividad de la enzima TPP1 sino que también lo haga con todas las enzimas lisosomales. Sin embargo, es más relevante para la patología estudiada el efecto de ese aumento de pH sobre la actividad de TPP1, ya que se sabe que esta proteasa inicia la degradación de la subunidad c de ATP-sintasa mitocondrial (y probablemente también la de otras proteínas hidrofóbicas menos abundantes). De hecho, la subunidad c sobre todo, junto a otros componentes muy hidrofóbicos, se encuentra presente en una elevada proporción en el material sin degradar que se acumula en los lisosomas de los fibroblastos CLN2 y CLN3 (Anderson *et al.*, 2013; Pal *et al.*, 2009). Así pues, y puesto que la actividad de TPP1 es esencial para evitar la acumulación en cuerpos de lipofusina de estas proteínas hidrofóbicas sin

degradar, un defecto parcial (como ocurre en los fibroblastos CLN3 y quizás en algunas formas de LINCL) o uno total (como ocurre en los fibroblastos CLN2) en la actividad de esa enzima, determinan que se acumule lipofuscina en los lisosomas a un ritmo diferente. Esto ocasionará de manera más o menos temprana (LINCL o JNCL, respectivamente) la acumulación de cuerpos de lipofuscina y una disminución progresiva en la función de la macroautofagia. Puesto que se ha observado que la acumulación de lipofuscina disminuye la actividad de las hidrolasas lisosomales en células humanas del epitelio pigmentario de la retina (Shamsi & Boulton, 2001), este podría ser el principal factor desencadenante de la inhibición de la autofagia en las lipofuscinosis ceroides neuronales y podría explicar el retraso en la aparición de la enfermedad en la variante CLN3.

3.1.2. Estudio de la vía ubiquitina-proteasomas

Puesto que hemos visto que la macroautofagia se encuentra alterada en los fibroblastos procedentes de pacientes de lipofuscinosis ceroides neuronal y que se sabe que las vías proteolíticas están interconectadas, quisimos averiguar si el otro de los dos mecanismos principales de degradación intracelular de proteínas, es decir, la vía ubiquitina-proteasomas, se encontraba también alterado en los fibroblastos CLN2 y CLN3.

La vía ubiquitina-proteasomas es, junto con la macroautofagia, el mecanismo de degradación intracelular de proteínas más importante que opera en las células eucarióticas (Ciechanover, 2012; Glickman & Ciechanover, 2002; Knecht *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2012), aunque ambas vías degradativas se diferencian en numerosos aspectos, principalmente en los sustratos que degrada cada una y en la especificidad en su reconocimiento. En ese sentido, los proteasomas se encargan, sobre todo pero no exclusivamente, de la degradación de proteínas desnaturalizadas o mal plegadas y de las proteínas con vidas medias cortas o muy cortas,

reconociéndolas de forma específica a través de su poliubiquitinación o de otras señales mucho más minoritarias (Amm *et al.*, 2014; Pickart, 1997).

Como ya se ha comentado en la Introducción general, la vía ubiquitina-proteasomas degrada las proteínas a través de un mecanismo continuo en dos etapas. En la primera, mediante una cascada enzimática se poliubiquitinan las proteínas que en una segunda etapa van a ser degradadas por el proteasoma 26S/30S hasta los aminoácidos constituyentes, siendo su actividad similar a la quimotripsina la más importante de las tres actividades proteolíticas que posee (Tanaka *et al.*, 2012). Por ello, hemos analizado de forma separada estos dos procesos, estudiando por un lado los niveles de proteínas poliubiquitinadas, que son los sustratos principales del proteasoma 26S/30S, y por otro la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas.

3.1.2.1. Análisis de los niveles de poliubiquitinación

El estudio se ha llevado a cabo por *Western-blot*, utilizando un anticuerpo, el FK2, que reconoce tanto a las proteínas mono como las poliubiquitinadas (figura 18). Los niveles de proteínas poliubiquitinadas se han estudiado en los fibroblastos control y en los procedentes de pacientes, en condiciones de alta o baja proteólisis y con o sin un inhibidor de la actividad de los proteasomal, el MG132, ya que una vez poliubiquitinadas las proteínas que van a degradarse son rápidamente eliminadas por los proteasomas. Comparando ambas situaciones, sin y con el inhibidor, podemos averiguar si la alteración de la ubiquitinación se debe al fallo en la primera, en la segunda o en las dos etapas de degradación a través de esta vía. De esta manera, tenemos una indicación de la actividad del primer paso de la vía ubiquitina-proteasomas, que es el más importante puesto que decidirá el destino final de la proteína así marcada. La inhibición se realizó durante un tiempo de 4 h, elegido para permitir analizar niveles suficientes de proteínas poliubiquitinadas.

Los resultados que se muestran en la figura 18 no indican cambios estadísticamente significativos en los niveles de las proteínas poliubiquitinadas en los fibroblastos de los pacientes respecto a los de los controles, en ninguna de las condiciones ensayadas (con y sin MG132, alta o baja proteólisis). Por tanto, esta primera etapa de ubiquitinación parece no tener un papel relevante en las lipofuscinoses ceroides neuronales infantil tardía y juvenil al no verse alterado el marcaje de proteínas para su degradación por los proteasomas.

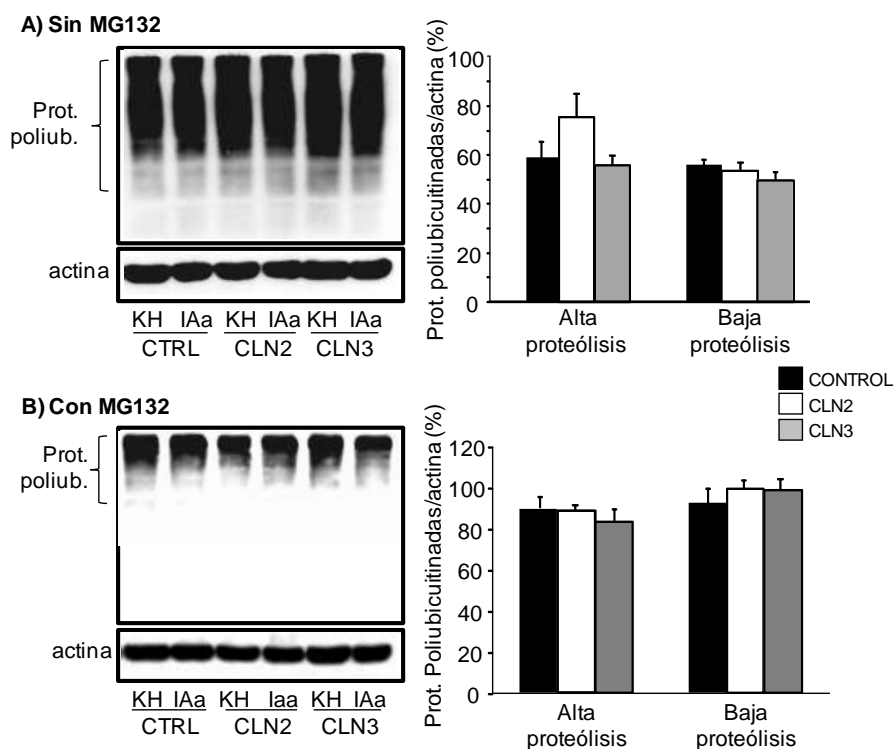


Figura 18. No se observan cambios significativos en la poliubiquitinación de proteínas en los fibroblastos CLN2 y CLN3 respecto los controles, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de los proteasomas MG132. Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 confluentes se incubaron en medio de baja o alta proteólisis durante 4 h sin (A) o con (B) el inhibidor de proteasomas MG132. Los resultados se presentan como porcentaje de los niveles de proteínas poliubiquitinadas respecto a los de actina, y representan la media y la desviación típica de tres experimentos por separado. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las condiciones estudiadas.

3.1.2.2. Actividad de los proteasomas

Los proteasomas tienen tres actividades proteolíticas (ver Introducción general). De ellas analizamos la actividad similar a la quimotripsina, ya que se ha demostrado que es la más relevante en la degradación intracelular de proteínas (Kisselev & Goldberg, 2005).

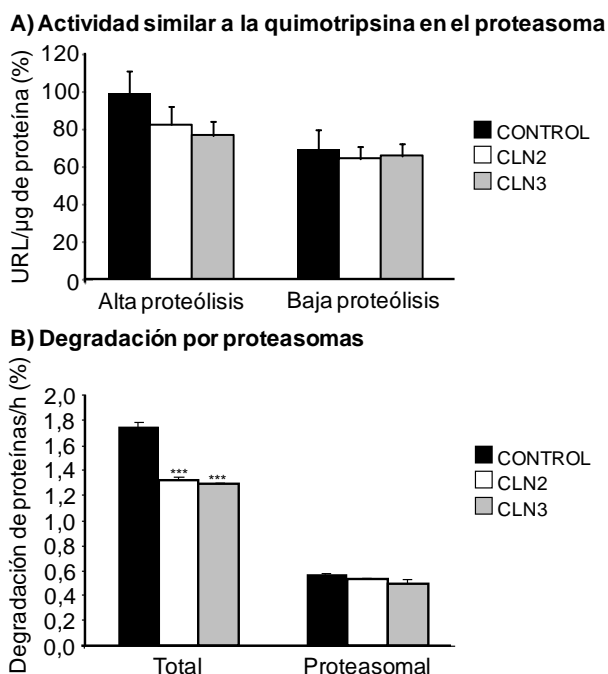


Figura 19. La actividad proteolítica de los proteasomas en los fibroblastos procedentes de pacientes no presenta alteraciones significativas. **A)** Para el ensayo por luminiscencia de la actividad de proteasomas se empleó el kit *Proteasome-Glo Cell-Based Assay* tal como se describe en el apartado de Metodología. Los ensayos se realizaron con fibroblastos humanos control, CLN2 y CLN3 en confluencia e incubados durante 90 min en condiciones de alta o baja proteólisis. Los resultados, en unidades relativas de luminiscencia (URL) por μg de proteína, se expresan en porcentaje respecto a los valores obtenidos en los fibroblastos control en medio de alta proteólisis y son la media y la desviación típica de tres experimentos por separado con muestras por triplicado. No se observaron cambios estadísticamente significativos en ninguna de las dos condiciones estudiadas. **B)** Los fibroblastos humanos control, CLN2 y CLN3 se incubaron con valina tritiada y se realizaron experimentos de «pulso» y «caza» para proteínas de vida media larga en medio de alta proteólisis como se describe en el apartado de Metodología. Se muestra la degradación de proteínas totales (ver figura 9) y la contribución de la vía proteasomal a esa degradación, determinada como se ha descrito anteriormente para lisosomas y macroautofagia, pero empleando lactacistina ($10\ \mu\text{M}$) como inhibidor de los proteasomas. Los resultados se presentan como porcentaje de las proteínas marcadas que se degradan por hora, y corresponden a la media y la desviación típica de entre ocho y quince experimentos independientes con muestras por duplicado. No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de proteínas degradadas por proteasomas entre las células control y las de pacientes. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los fibroblastos control (**** $p < 0,005$).

Los resultados, que se presentan en la figura 19A, no muestran ninguna diferencia significativa entre los fibroblastos procedentes de pacientes y los control en ninguna de las dos condiciones ensayadas.

Muchas veces, pero no siempre, cuando se produce un defecto en una de las vías proteolíticas ocurre un aumento de otra actividad para tratar de paliar, al menos parcialmente, ese defecto (Benbrook & Long, 2012; Rodríguez-Muela *et al.*, 2013). Por eso tratamos de ver si se producía un aumento de la actividad proteasomal para compensar la disminución de la macroautofagia que ocurre cuando las células se incuban en medio de alta proteólisis. Para ello se analizó también la actividad de los proteasomas mediante experimentos de «pulso» y «caza» en condiciones de alta proteólisis para proteínas de vida media larga (figura 19B). Como era de esperar, por datos anteriores del laboratorio (Fuentes *et al.*, 2003b), en condiciones de alta proteólisis se produce un pequeño aumento en la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas. Sin embargo, nuevamente comprobamos que la degradación proteasomal no se ve afectada de forma significativa ni en los fibroblastos procedentes de pacientes con la variante infantil tardía de lipofuscinosis ceroida neuronal ni en los de pacientes con la variante juvenil de la enfermedad.

Por tanto, si resumimos los resultados de la poliubiquitinación (ver figura 18), los de la actividad similar a la quimotripsina de los proteasomas (ver figura 19A) y los experimentos de «pulso» y «caza» (ver figura 19B), podemos concluir que la vía ubiquitina-proteasomas no se ve alterada de forma significativa en ninguna de sus dos etapas, ni en la ubiquitinación ni en la degradación propiamente dicha de los sustratos poliubiquitinados en los fibroblastos procedentes de pacientes. Por tanto, esta vía de degradación intracelular de proteínas, que junto a la macroautofagia es la más importante en la degradación intracelular de proteínas, no juega aparentemente un papel relevante en las dos patologías estudiadas. Por tanto, las alteraciones que observamos en la degradación intracelular de proteínas (ver figura 9) corresponderían todas a las vías lisosomales y, más

en concreto, a la macroautofagia (ver arriba toda la sección 3.1.1 de este apartado).

3.2. Estudio de algunas de las vías de señalización implicadas en la regulación de la macroautofagia

En los resultados presentados hasta ahora hemos mostrado que los fibroblastos CLN2 y CLN3 presentan una menor degradación intracelular de proteínas a través de las vías lisosomales, y que este descenso puede explicarse debido a una reducción en la actividad macroautofágica. Además, hemos visto alteraciones en la formación de las vacuolas autofágicas en ambas líneas celulares, así como también cambios en los valores del pH lisosomal en los fibroblastos CLN3.

La macroautofagia es un proceso altamente regulado y sus principales, pero no únicos, reguladores son los hormonales, como la insulina, y los nutricionales, como los aminoácidos. Por tanto, hemos utilizado la insulina y los aminoácidos de forma conjunta para analizar las principales vías de señalización que regulan la macroautofagia en respuesta a estas señales hormonales y nutricionales. Sin embargo, conviene señalar que la regulación de la macroautofagia es complejísima y el estudio en un solo trabajo del gran número de vías reguladoras que se han propuesto hasta ahora es una tarea prácticamente imposible. Por eso aquí nos hemos limitado a hacerlo con las más importantes y mejor establecidas. Hemos dejado de lado, por ejemplo, otras vías reguladoras también importantes, como las que transcurren a través de AMPK y de la fosforilación de Ulk1 (ver Moruno, tesis doctoral y Ghislat, tesis doctoral), porque en cualquier caso ejercen su acción a través de mTOR. Por ejemplo, mTOR y AMPK son las quinasas responsables de la fosforilación de Ulk1 con efectos opuestos (Alers *et al.*, 2012).

La cascada de señalización celular iniciada por la insulina se conoce desde hace tiempo. Brevemente, la acción de esta hormona comienza con la unión a su receptor tirosina quinasa en la superficie celular y su posterior

activación. Tras la unión de la insulina, el receptor sufre una serie de transfosforilaciones intramoleculares y fosforila también residuos de tirosina de un importante número de sustratos próximos que incluyen, entre otros, a miembros de la familia de sustratos del receptor de la insulina (IRS1/2/3/4) (Gual *et al.*, 2005). La fosforilación en tirosinas de las proteínas IRS crea sitios de reconocimiento para moléculas efectoras adicionales que contienen dominios SH2, entre las que, de manera más importante, se incluye la subunidad reguladora de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) de clase IA. Una de las dianas de PI3K es la proteína quinasa B (PKB), una serina/treonina quinasa también llamada Akt (Yasukawa *et al.*, 2005). Akt evita la formación del complejo TSC1/2 (complejo de esclerosis tuberosa 1/2) mediante la fosforilación de la proteína TSC2. Este complejo induce la actividad GTPasa de RHEB, que en su forma unida al GTP actúa como un activador del complejo mTORC1, inhibiendo así la autofagia (Wang & Levine, 2010).

En cambio, por lo que respecta a los aminoácidos, no existe un consenso general para el mecanismo mediante el cual, tanto su presencia como su ausencia, regulan la autofagia, e incluso cuando se ha propuesto una determinada vía tampoco se han esclarecido todos los pasos implicados en esa señalización (Ghislat *et al.*, 2012; Jewell *et al.*, 2013). Además, incluso los aminoácidos reguladores (ya que no todos los veinte lo son) pueden ser diferentes dependiendo del tipo celular (Esteban *et al.*, 2007). En cualquier caso, los aminoácidos parece que también y sobre todo regulan la macroautofagia a través de mTORC1 (Meijer, 2008; Yan & Lamb, 2012). Así, por ejemplo, hace casi una década algunos grupos (Byfield *et al.*, 2005; Nobukini *et al.*, 2005) propusieron que los aminoácidos estimulaban mTORC1 a través de la PI3K de clase III, aunque esta hipótesis no está clara debido a que esta enzima también participa en la iniciación de la autofagia de un modo independiente de mTOR (Maiuri *et al.*, 2010). También se ha descrito que el sensor de aminoácidos LRS (Leucil-tRNA sintetasa) en mamíferos (Han *et al.*, 2012) activa a mTORC1 a través de la

GTPasa Rac, un mediador bien caracterizado de la disponibilidad de aminoácidos en el citosol.

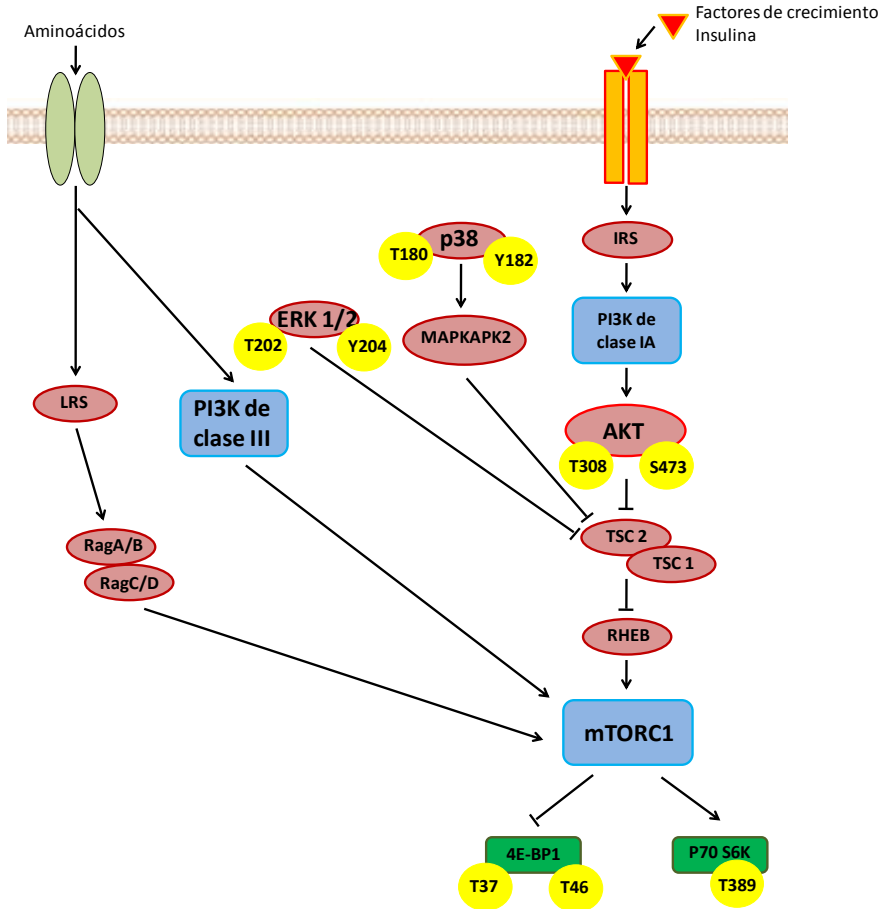


Figura 20. Esquema simplificado de algunas de las principales proteínas que intervienen en la regulación de la macroautofagia a través de mTOR por hormonas y nutrientes y que se mencionan aquí. Los círculos en amarillo indican las fosforilaciones estudiadas en este trabajo. Ver explicación en el texto.

Por tanto, puesto que la insulina y los aminoácidos regulan la autofagia, y ambos reguladores ejercen o pueden ejercer su acción a través de mTOR (Jung *et al.*, 2010), hemos estudiado los niveles de fosforilación de varias proteínas corriente arriba de mTOR, como Akt y dos MAPK, la p38 α y ERK1/2. Finalmente, hemos estudiado los niveles de fosforilación de dos

sustratos de mTOR, p70 S6K y 4E-BP1, cuya fosforilación es indicativa de la actividad del complejo mTORC1 y, por tanto, de la inhibición de la autofagia (figura 20).

En la figura 21 se muestra cómo después de la incubación con insulina y aminoácidos (IAa), Akt se encuentra significativamente más fosforilada en la T308 (que responde a los estímulos hormonales) en los fibroblastos CLN3 y en los CLN2 respecto a sus controles. Mientras que en la S473, que responde a los estímulos nutricionales, solo está activada en los fibroblastos CLN2. El aumento en la fosforilación de Akt en los fibroblastos CLN2 y CLN3 es coherente con el descenso en la formación de las vacuolas autofágicas observado mediante el análisis del marcador LC3-II (ver figura 11), puesto que la activación de esta vía conduce a la activación de mTOR y, por tanto, a la inhibición de la formación de las vacuolas autofágicas.

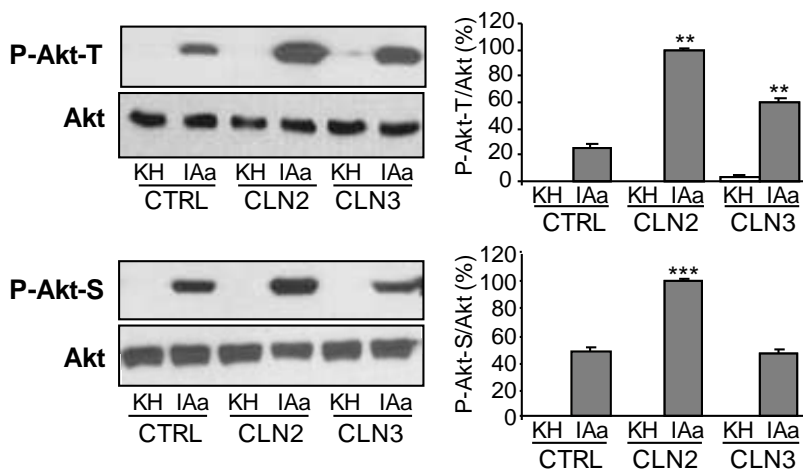


Figura 21. El activador de mTOR, Akt, se encuentra más fosforilado en los fibroblastos CLN3 y, sobre todo, en los CLN2. Los fibroblastos control (CTRL), CLN2 y CLN3 se incubaron en medio de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis. Los lisados se analizaron mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas de Akt, Akt-Thr 308 (P-Akt-T) y Akt-Ser 473 (P-Akt-S), y frente a Akt total. Las bandas correspondientes a las dos formas fosforiladas, obtenidas a partir de tres experimentos diferentes, se densitometraron y se normalizaron respecto a la proteína total (Akt). Los datos se representan como porcentaje relativo al valor máximo. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los correspondientes valores control en condiciones de alta o baja proteólisis (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

En estas mismas condiciones, por su relación directa con el estrés celular, analizamos también los niveles de fosforilación de las MAPK p38 α y ERK1/2 (figura 22). Estas dos quinasas pueden activar a mTOR y responden generalmente a citoquinas proinflamatorias y a señales por estrés, como el térmico, el osmótico o el oxidativo. Además, ERK1/2 se activa también en respuesta a varios factores de crecimiento (Plotnikov *et al.*, 2011; Roskoski, 2012).

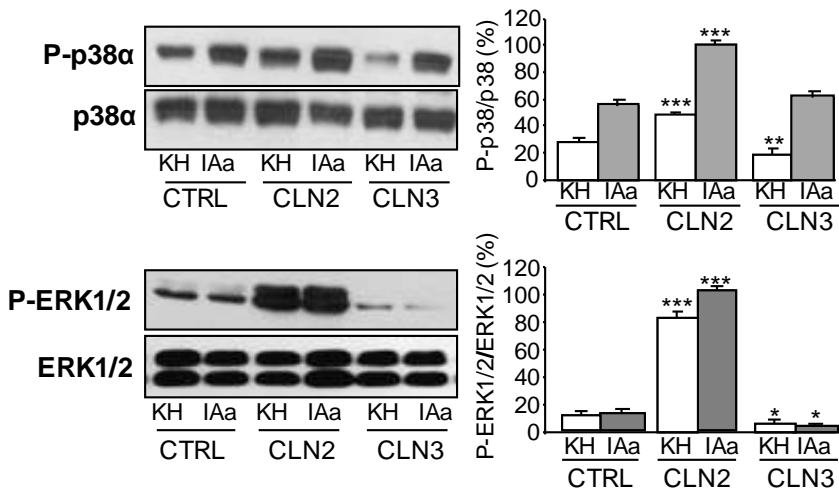


Figura 22. Las MAPK p38 α y ERK1/2 se encuentran también significativamente más activadas en los fibroblastos CLN2. Los fibroblastos control (CTRL), CLN2 y CLN3 se incubaron en medio de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis. Los lisados se analizaron mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas de p38 α (P-p38 α) y ERK1/2 (P-ERK 1/2) así como para sus respectivas formas totales, p38 α y ERK1/2. Las bandas correspondientes a las dos formas fosforiladas, obtenidas a partir de tres experimentos diferentes, se densitometraron y se normalizaron respecto a su correspondiente proteína total. Los datos se representan en porcentaje relativo al valor máximo en cada caso. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores control correspondientes para las condiciones de alta y baja proteólisis (*p<0,05, **p<0,01 y ***p<0,005).

Los resultados obtenidos muestran que ambas MAPK se encuentran considerablemente más activadas en los fibroblastos CLN2. En cambio, en los fibroblastos CLN3 estas MAPK se encuentran ligeramente pero de manera significativa menos activadas que en los fibroblastos control, e incluso en el caso de p38 α en condiciones de baja proteólisis no hubo

diferencias significativas con los fibroblastos control. Estas diferencias en la activación de ambas MAPK entre los fibroblastos control y procedentes de pacientes de LINCL y JNCL pueden deberse a una mayor activación en respuesta a la insulina, o a diferentes niveles de factores de estrés en estas células, que son uno de los factores moduladores de la actividad de estas MAPK.

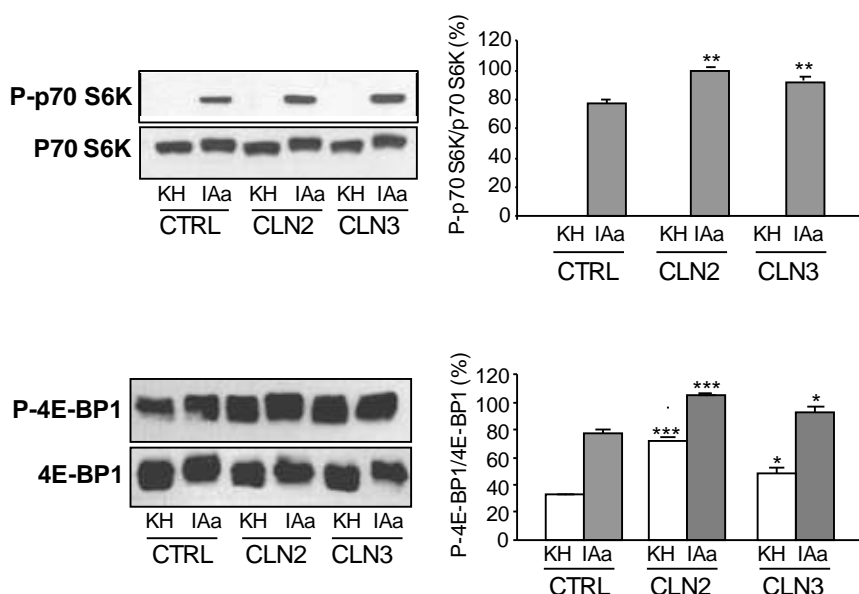


Figura 23. Los sustratos de mTOR, p70 S6K y 4E-BP1 se encuentran significativamente más activados en los fibroblastos CLN2 y CLN3. Los fibroblastos control (CTRL), CLN2 y CLN3 se incubaron en medio de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis. Los lisados se analizaron mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a las formas fosforiladas de p70 6SK (P-p70 S6K) y 4E-BP1 (P-4E-BP1), así como frente a sus respectivas formas totales, p70 6SK y 4E-BP1. Las bandas correspondientes a las dos formas fosforiladas, obtenidas a partir de tres experimentos diferentes, se densitometraron y se normalizaron respecto a su correspondiente proteína total. Los datos se representan en porcentaje relativo al valor máximo en cada caso. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores control en las correspondientes condiciones de alta o baja proteólisis (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

Aunque existen algunas interpretaciones alternativas, la mayoría de autores considera que Akt y las MAPK p38 α y ERK1/2 convergen a nivel de mTOR (Knecht *et al.*, 2009). Por eso finalmente, a fin de estudiar el nivel de actividad de mTOR y, por tanto, la inhibición de la autofagia, analizamos en esas mismas condiciones de alta y baja proteólisis los niveles de

activación de dos de sus sustratos inmediatos, la quinasa p70 S6 (p70 S6K) y la proteína 1 de unión a 4E (4E-BP1) (figura 23).

Los resultados muestran, como era de esperar por los datos de la literatura (Knecht *et al.*, 2009; Sengupta *et al.*, 2010), una mayor fosforilación de los sustratos de mTOR en condiciones de baja proteólisis. Esto ocurre en todos los tipos celulares estudiados aquí y esa situación corresponde a cuando la macroautofagia está notablemente reducida por la actividad de mTOR. Además, los datos obtenidos en esos experimentos indican que los sustratos de mTOR, p70 S6K y 4E-BP1, están significativamente más fosforilados en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con los controles. Sin embargo, este aumento en la fosforilación ocurre en menor medida en CLN3. Por tanto, estos resultados están en concordancia con los presentados anteriormente en cuanto a que existe una mayor inhibición de la macroautofagia en las células procedentes de pacientes de LINCL y JNCL, a los que se añade ahora la conclusión de que mTOR jugaría un papel importante en esa reducción.

Así pues, la reducción en la formación de los autofagosomas puede estar relacionada con la activación, como consecuencia de una señal no identificada, de la vía Akt-mTOR, especialmente en los fibroblastos CLN2, y de las quinasas p38 α y ERK1/2, que también pueden converger en mTOR.

Analizando en conjunto los resultados obtenidos hasta ahora, no solamente encontramos diferencias significativas entre los fibroblastos control y los procedentes de pacientes sino también entre estos últimos. Estas diferencias podrían ayudar a explicar el que la edad de aparición y la gravedad de las variantes infantil tardía (LINCL) y juvenil (JNCL) sean distintas. En ese sentido, en los resultados que aquí se presentan se muestra un aumento de aproximadamente 0,5 unidades en el pH lisosomal en los fibroblastos CLN3 (JNCL) pero no en los CLN2 (LINCL). Este aumento reduciría de forma significativa la actividad de la enzima TPP1, que se encuentra ausente en LINCL. La enzima TPP1 inicia la degradación de proteínas hidrofóbicas pequeñas, como la subunidad c de la ATP-sintasa

mitocondrial, que se acumula en estas dos variantes, en los depósitos de lipofuscina del interior de los lisosomas de estos pacientes. La mayor reducción en la actividad de la enzima TPP1 en LINCL contribuirá a una mayor alteración en la regulación de la macroautofagia, probablemente afectando a las vías de señalización que regulan esta vía degradativa. Por tanto, estas diferencias entre las células CLN2 y CLN3 podrían explicar las diferencias en la edad de aparición de las dos variantes de la enfermedad.

3.3. Análisis de posibles alteraciones en la actividad de vías endocíticas

Tanto las vías autofágicas como las endocíticas convergen en los lisosomas para degradar su contenido. Además, ambos procesos comparten proteínas implicadas en su regulación, como la PI3K de clase IA o la proteína Rab5 entre otras (Dou *et al.*, 2013; Hunker *et al.*, 2006). Puesto que a través de estos dos mecanismos se acumula material sin degradar en el interior de los lisosomas, las alteraciones observadas en la función lisosomal podrían tener también consecuencias sobre los diferentes mecanismos de endocitosis. Por ello hemos estudiado las principales vías endocíticas en fibroblastos de pacientes de LINCL y JNCL en comparación con los fibroblastos control. Concretamente, y dentro de la gran variedad de estas vías, nos hemos centrado en tres: la macropinocitosis, la endocitosis mediada por receptor, dependiente de clatrina y dinamina, y la endocitosis mediada por caveolas dependiente de dinamina.

3.3.1. Macropinocitosis

La macropinocitosis es un proceso endocítico dependiente de actina, en el que, mediante extensiones de la membrana plasmática que se pliegan sobre ella misma, se internaliza el medio extracelular secuestrado. Las vacuolas formadas, los macropinosomas, presentan un tamaño variable entre 0,2 y 5 μm (Bohdanowicz & Grinstein, 2013; Donaldson *et al.*, 2009).

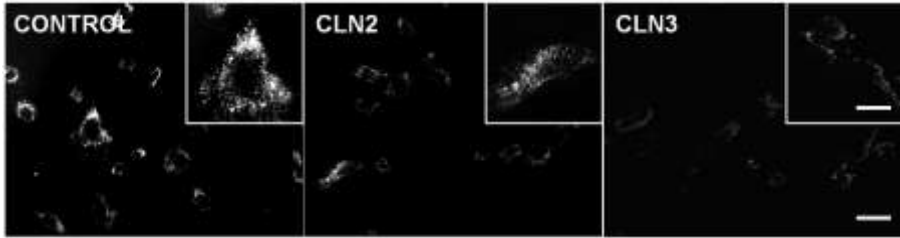


Figura 24. La macropinocitosis se encuentra reducida en los fibroblastos CLN2 y, especialmente, en los CLN3. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de fibroblastos control, CLN2 y CLN3 incubados en medio de alta proteólisis, primero durante 1 h a 37 °C y, a continuación, durante 2 h añadiendo 0,5 mg/ml de FITC-dextrano, tal y como se describe en Metodología. Barra: 50 µm. Las ampliaciones muestran las células con un mayor aumento. Barra: 20 µm.

Para estudiar la macropinocitosis comparamos, mediante microscopía de fluorescencia, la internalización del FITC-dextrano por parte de los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 en medio de alta proteólisis. Como se muestra en la figura 24, la macropinocitosis es menor en los fibroblastos CLN2 y CLN3 que en los controles.

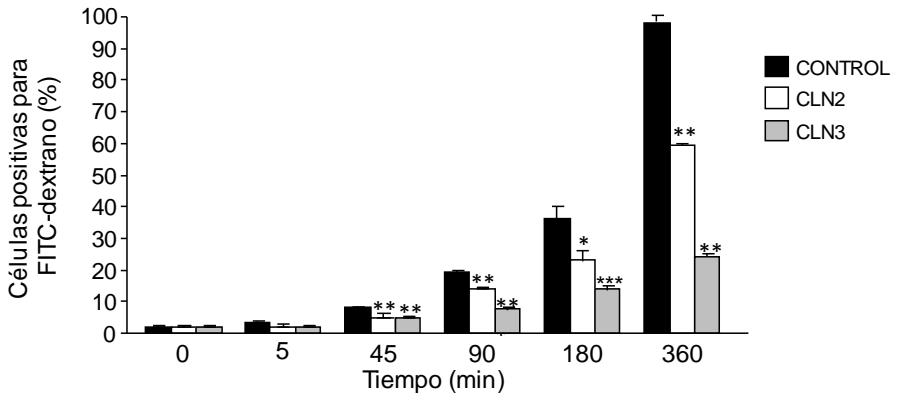


Figura 25. La macropinocitosis se encuentra disminuida en los fibroblastos CLN2 y CLN3. Para cuantificar la internalización a través de la macropinocitosis, los fibroblastos se incubaron en medio de alta proteólisis durante 1 h a 37 °C y a este medio se añadieron 0,5 mg/ml de FITC-dextrano durante los periodos de tiempo indicados en el histograma. A continuación se lavaron las células con PBS frío y se analizaron mediante citometría de flujo tal y como se describe en Metodología. Los resultados indican el porcentaje de células fluorescentes marcadas con FITC y representan la media y la desviación típica de tres experimentos independientes con muestras por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los correspondientes valores control en cada momento (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

Para confirmar estos resultados, estudiamos la macropinocitosis mediante otra técnica, la citometría de flujo, incubando las células con FITC-dextrano a diferentes tiempos, desde 0 hasta 360 min. Tras las 6 h de internalización, el porcentaje de células que contenían FITC-dextrano en CLN2 y CLN3 era menor que en los fibroblastos control, en aproximadamente un 35 % y 70 % respectivamente (figura 25).

A pesar de que aparentemente la macropinocitosis en los fibroblastos CLN3 es menor que en los CLN2, hay que tener en cuenta que el FITC es un fluoróforo cuya intensidad de fluorescencia es dependiente del pH. Por eso, una parte del descenso observado en el porcentaje de células que han internalizado este fluoróforo en los fibroblastos CLN3 se debe al aumento del pH lisosomal en estas células. Los experimentos realizados anteriormente para determinar el pH lisosomal, en los que también se utilizó este mismo fluoróforo, permiten estimar que el descenso real en la actividad de la macropinocitosis en los fibroblastos CLN3 sería solamente la mitad aproximadamente del observado (ver tabla 2). Por tanto, la macropinocitosis en CLN3 está alterada de forma similar a como lo está en CLN2.

3.3.2. Endocitosis mediada por el receptor de EGF

En la endocitosis mediada por receptor, las células internalizan de forma continua los receptores de su superficie a través de un proceso dependiente de clatrina y dinamina. Tras su internalización, se reciclan o se dirigen a los lisosomas para su degradación en proporciones variables dependiendo del receptor (Mayor & Pagano, 2007). Concretamente, el receptor de EGF, que es el que hemos elegido para estudiar esta endocitosis en los fibroblastos control, CLN2 y CLN3, corresponde al grupo de receptores que se dirigen mayoritariamente a degradación.

En líneas generales, la endocitosis de EGF, como otras endocitosis mediadas por receptor, puede dividirse en tres etapas principales: la unión del ligando al receptor, la internalización del complejo ligando-receptor y la degradación del ligando una vez liberado del receptor.

Para estudiar la unión del EGF a su receptor utilizamos AF488-EGF a tres concentraciones diferentes (0,2, 2 y 10 $\mu\text{g/ml}$), la mayor de ellas unas 100 veces más elevada que las utilizadas habitualmente en los ensayos de endocitosis. A ninguna de estas concentraciones se encontraron diferencias significativas en la unión del ligando al receptor entre los fibroblastos control y los CLN2 y CLN3 (datos no mostrados). Así pues, parece que esta etapa no se encuentra alterada en las células procedentes de pacientes.

3.3.2.1. Internalización del ligando

Para analizar la etapa de internalización en la endocitosis mediada por el receptor de EGF estudiamos mediante citometría de flujo las diferentes células, incubadas con el AF488-EGF a diferentes tiempos, desde 0 hasta 90 min.

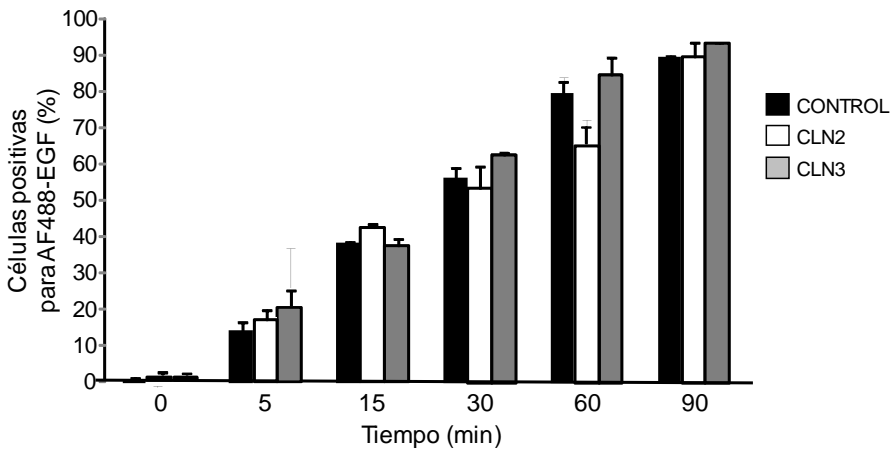


Figura 26. La internalización de EGF no presenta cambios significativos en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con los fibroblastos control. Tal como se describe en Metodología, los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron a 37 °C durante 1 h en medio de alta proteólisis, añadiendo a continuación 200 ng/ml de AF488-EGF durante los tiempos que se indican. Las medidas de citometría de flujo se tomaron después de lavar las células y de una incubación de 30 min a 37 °C. En el histograma se muestran los porcentajes de células marcadas, y representan la media y la desviación típica de tres experimentos independientes con muestras por triplicado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

Los resultados de la figura 26 muestran que la internalización del ligando tampoco se encuentra alterada de forma significativa en los fibroblastos procedentes de pacientes.

3.3.2.2. Degradación de EGFR

Una vez endocitado, el complejo receptor-ligando viaja hasta los endosomas tardíos. Allí se separa del receptor y continúa hasta los lisosomas para degradarse. Por su parte, el receptor también puede seguir la vía lisosomal para degradarse o puede entrar en un proceso de reciclaje para volver de nuevo a la membrana plasmática.

Puesto que tanto el ligando como el receptor llegan hasta los lisosomas para su degradación y, además, el receptor puede incorporarse a un proceso de reciclaje de nuevo hacia la membrana plasmática, hemos estudiado estos dos procesos para EGFR en los fibroblastos CLN2 y CLN3, ya que podrían verse afectados como consecuencia de las alteraciones lisosomales observadas en estas células.

Para analizar la degradación del receptor de EGF, incubamos los fibroblastos durante diferentes tiempos a una concentración del ligando de 100 ng/ml que, a diferencia de concentraciones inferiores, hace que el 90 % de su receptor se dirija también a los lisosomas para su degradación (Sigismund *et al.*, 2008).

Los resultados de la figura 27 muestran un retraso en la degradación de EGFR inducida por el ligando en los fibroblastos CLN3 cuando se comparan con los fibroblastos control, mientras que no se obtuvieron diferencias significativas en los fibroblastos CLN2.

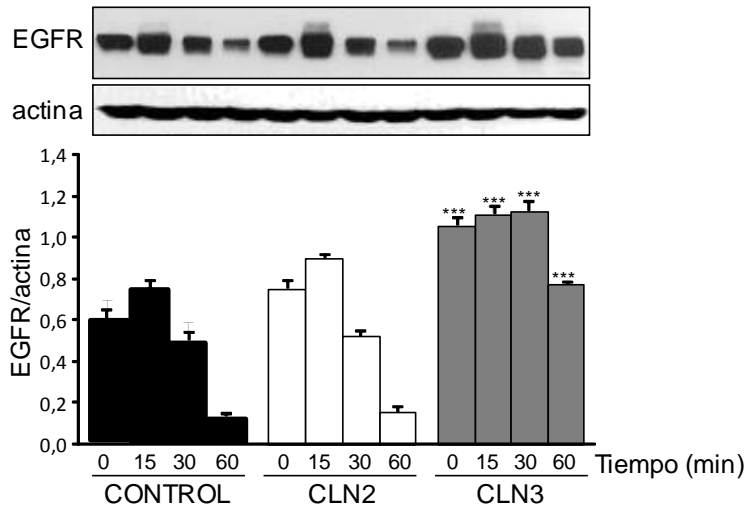


Figura 27. EGFR se acumula en los fibroblastos CLN3. Tal como se describe en Metodología, los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron durante 30 min en medio de alta proteólisis, añadiendo a continuación 100 ng/ml de EGF para estudiar la degradación de este receptor durante los tiempos que se indican. Los extractos totales preclarificados se analizaron mediante *Western-blot* con anticuerpos frente a EGFR. En el histograma se representan las medias y desviación estándar de los valores de densitometría de tres experimentos independientes. Los valores obtenidos corresponden a la relación de EGFR respecto a la actina (** $p < 0,005$).

En estas mismas condiciones, se analizó la fosforilación de EGFR y solamente se observaron unos niveles de fosforilación superiores a los del control en CLN3 (figura 28). En conjunto, la menor degradación y la mayor fosforilación del receptor sugieren que el complejo receptor-ligando tarda más en llegar hasta los lisosomas, acumulándose seguramente en los endosomas tempranos y/o tardíos. Esto puede ser debido al aumento en el pH lisosomal en los fibroblastos CLN3, que daría lugar a alteraciones en la fusión de las vesículas.

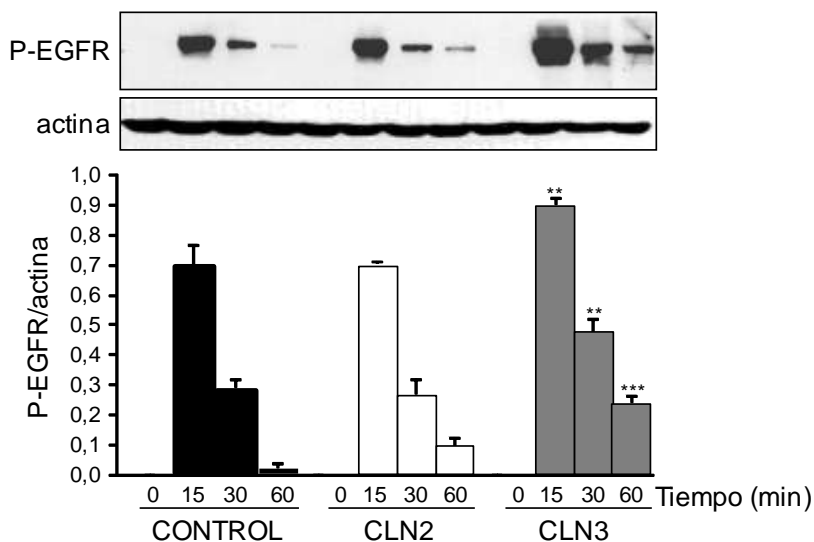


Figura 28. La fosforilación de EGFR se encuentra aumentada en los fibroblastos CLN3. Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron en medio de alta proteólisis durante 1 h a 37 °C, y a continuación se añadió 100 ng/ml de EGF durante los tiempos que se indican, tal y como se explica en Metodología. Los extractos totales preclarificados se analizaron por *Western-blot* con anticuerpos frente a la forma fosforilada (T-845) de EGFR. En el histograma se representa la media de al menos tres experimentos diferentes, en los que se ha calculado la proporción de EGFR fosforilado respecto a la actina. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los correspondientes valores control en cada momento (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

3.3.2.3. Reciclaje de EGFR

Puesto que los resultados de degradación y fosforilación de EGFR en los fibroblastos CLN3 indican que el complejo receptor-ligando puede estar acumulándose en los endosomas, es posible que su reciclaje hasta la membrana plasmática también se encuentre alterado.

Para estudiar esta posibilidad, se marcaron con biotina las proteínas presentes en la superficie de la membrana plasmática (carril 1 de cada línea celular de la figura 29). Se añadió EGF 2 ng/ml para favorecer la internalización de su receptor (EGFR) y, pasados 30 min, se eliminó la biotina presente en la membrana plasmática tratando las células con glutatión reducido, dando lugar al remanente intracelular de EGFR y demás proteínas biotiniladas (carril 2 de cada línea celular de la figura 29). A continuación, se permitió el reciclaje del remanente intracelular de EGFR de nuevo hacia la membrana plasmática añadiendo EGF 2 ng/ml, durante

30 min (carril 3 de cada línea celular de la figura 29). Tras esta segunda incubación también se eliminó con glutatión reducido la biotina de las proteínas recicladas presentes en la membrana, con lo que obtenemos la cantidad de EGFR biotinilado todavía presente en el interior de la célula (carril 4 de cada línea celular de la figura 29). Por tanto, estimamos la proporción de receptor reciclado mediante la diferencia entre las calles 3 y 4 de cada línea celular.

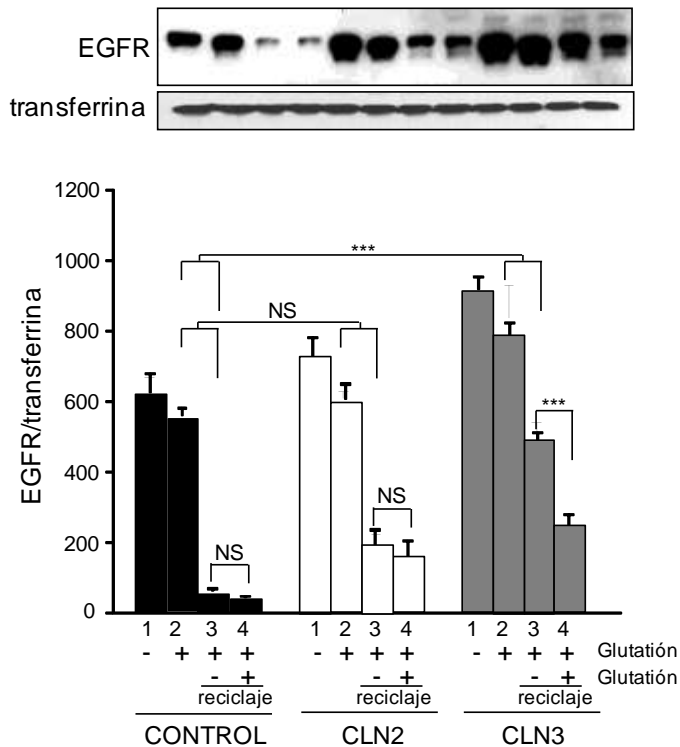


Figura 29. El reciclaje de EGFR se encuentra aumentado en los fibroblastos CLN3. Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron en medio de alta proteólisis durante 1 h a 37 °C. A continuación las células se trataron con 2 ng/ml de EGF marcando el receptor de superficie con biotina y añadiendo glutatión donde se indica, tal y como se explica en Metodología. Las proteínas unidas a estreptavidina se recuperaron y se analizó la cantidad de receptor biotinilado mediante *Western-blot* con anticuerpos frente a la forma total de EGFR. En el histograma se representa la media de al menos tres experimentos diferentes expresados como intensidad relativa de EGFR respecto a la transferrina. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los correspondientes valores control en la degradación (calculada como la diferencia entre las calles 2 y 3) y en el reciclaje (calculado como la diferencia entre las calles 3 y 4) de EGFR (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,005).

La figura 29 muestra un mayor reciclaje de EGFR solamente en los fibroblastos CLN3. Por tanto, en estas células el receptor acumulado en los endosomas no avanzaría hacia su degradación en los lisosomas, sino que se reciclaría hacia la membrana.

Tomados en conjunto, estos datos sugieren que, como consecuencia del aumento en el pH lisosomal, en los fibroblastos CLN3 el EGFR endocitado se puede estar acumulando inicialmente en los endosomas, sin poder pasar a los lisosomas para ser degradado, con lo que su reciclaje hacia la superficie celular se encuentra aumentado.

3.3.3. Endocitosis mediada por caveolas

Por último, estudiamos la actividad de la vía endocítica mediada por caveolas. Para ello utilizamos BodiPY FLC5, un fluoróforo que se internaliza específicamente a través de esa vía (Marks *et al.*, 2008).

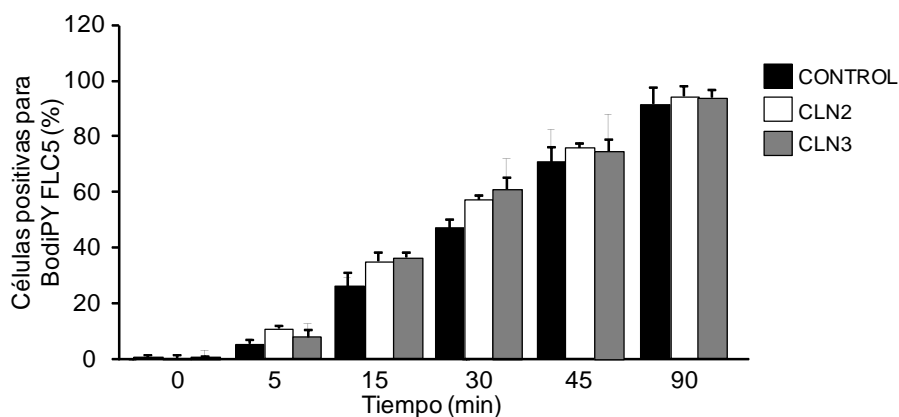


Figura 30. La endocitosis mediada por caveolas no está alterada en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en comparación con las células control. Tal como se describe en Metodología, los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron a 37 °C durante 1 h en medio de alta proteólisis, añadiendo a continuación 0,5 μ M de BodiPY FL Ceramida durante los tiempos que se indican. Las muestras se analizaron por citometría de flujo tras su procesamiento, como se indica en Metodología. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ningún caso.

El análisis por citometría de flujo con BodiPY FL Ceramida se realizó a tres concentraciones diferentes (0,5, 1 y 5 μ M), la mayor de ellas 10 veces más

elevada que la utilizada en los ensayos de internalización. No se encontraron diferencias significativas en la unión del ligando a su receptor entre los fibroblastos control y los CLN2 y CLN3 a ninguna de estas concentraciones (datos no mostrados). Así pues, al igual que en la endocitosis mediada por clatrina, parece que en la mediada por caveolas esta etapa de unión no se encuentra alterada en las células procedentes de pacientes.

Tampoco se observaron diferencias significativas entre los fibroblastos control y los procedentes de pacientes en cuanto a la internalización del fluoróforo mediante citometría de flujo (figura 30).

3.4. Otras consecuencias de la alteración de la macroautofagia en fibroblastos humanos de pacientes de LINCL y JNCL

Puesto que los fibroblastos CLN2 y CLN3 presentaban como rasgo característico la acumulación de material sin degradar en el interior de los lisosomas y una disminución en la macroautofagia, cabe pensar que esta alteración pueda tener diferentes consecuencias negativas para las células. En este trabajo hemos investigado dos de ellas: a) las posibles alteraciones en el ciclo celular y b) las posibles alteraciones en el transporte de las enzimas lisosomales.

3.4.1. Alteraciones en el ciclo celular

Durante la realización de los diferentes ensayos del presente trabajo se observó que los fibroblastos CLN2 y CLN3 muestran un crecimiento más lento que los fibroblastos control. Para determinar si existían diferencias en el crecimiento entre las células control y las procedentes de pacientes realizamos curvas de crecimiento para todas las líneas de fibroblastos.

En la figura 31 se muestra que en las células de los pacientes y, en especial en los fibroblastos CLN2, el crecimiento celular se encuentra algo reducido. Para calcular el tiempo de duplicación de la población se tomó el tramo lineal de cada

una de las curvas de crecimiento y el resultado obtenido fue de 33, 38 y 36 h para los fibroblastos control, CLN2 y CLN3, respectivamente.

Al analizar la viabilidad celular utilizando Tripan Blue, los resultados mostraron una viabilidad cercana al 100 % en todos los casos (resultados no mostrados), por lo que la disminución en el crecimiento celular obtenido para las líneas CLN2 y CLN3 no se debe a una menor viabilidad de estas células. Así pues, estudiamos si este menor crecimiento celular estaba relacionado con una posible alteración en el ciclo celular.

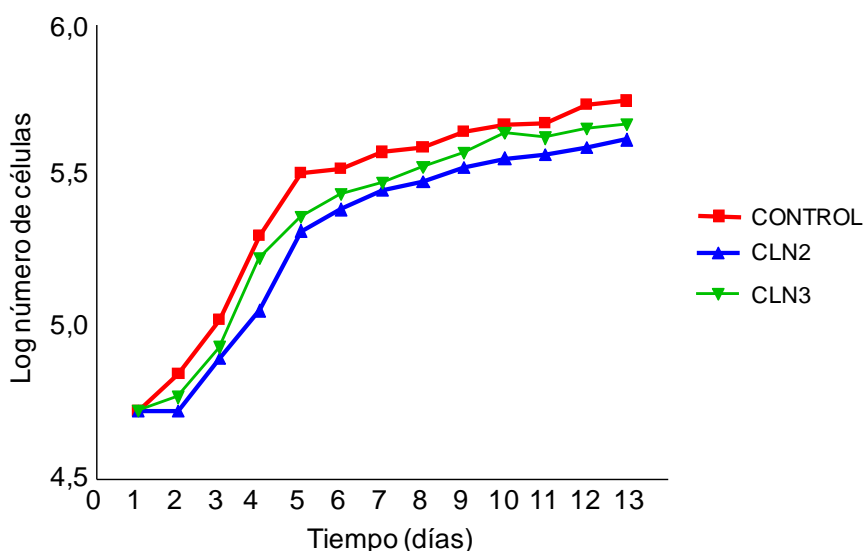


Figura 31. Los fibroblastos CLN3 y, en mayor medida los CLN2, crecen más lentamente que las células control. Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se cultivaron en medio completo durante doce días cambiando el medio cada tres días, tal como se describe en Metodología. Inicialmente se sembraron 50.000 células por línea y los recuentos se realizaron diariamente.

El análisis del ciclo celular se realizó por citometría de flujo con yoduro de propidio, que permite separar las diferentes poblaciones celulares según su contenido en ADN y, por tanto, las diferencia según la fase del ciclo celular en la que se encuentren. Los resultados de la figura 32 muestran que los fibroblastos CLN2 se acumulan en la fase G_0/G_1 de forma significativamente mayor de lo que lo hacen los fibroblastos control. Esto ocurre a expensas de la fase S, puesto que el porcentaje de células que se encuentran en dicha

fase está también disminuido de forma significativa. El porcentaje de células en G₂/M solamente se ve disminuido de forma no significativa en comparación con los fibroblastos control. La disminución en el número de células en fase S y el aumento en la fase G1 puede dar lugar a un enlentecimiento del ciclo celular en los fibroblastos CLN2, lo que explicaría las diferencias en la curva de crecimiento obtenida para estos fibroblastos en comparación con las células control. En cambio, no hubo diferencias significativas en ninguna de las etapas del ciclo celular en los fibroblastos CLN3 al compararlos con los fibroblastos control.

El ciclo celular está regulado, entre otros factores, por los niveles de ROS, ya que su acumulación retrasa el ciclo celular antes de que tenga lugar la división de la célula, evitando la transmisión de mutaciones en el ADN a las siguientes generaciones (Zhu *et al.*, 2014). Así pues, ya que una de las funciones de la autofagia es eliminar los orgánulos dañados, como las mitocondrias, el hecho de que la autofagia se encuentre disminuida en los fibroblastos CLN2 y CLN3 puede llevar a pensar que se pueden estar acumulando mitocondrias dañadas, lo que daría lugar a unos mayores niveles de ROS y por tanto, al aumento del estrés oxidativo (Filippon *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2010). Este aumento en el estrés oxidativo, que se observa en otras enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer, Parkinson, etc. (Wang *et al.*, 2013; Yan *et al.*, 2013), podría alterar el ciclo celular en los fibroblastos CLN2, explicando así el mayor tiempo de duplicación.

Para comprobarlo, hemos medido los niveles de ROS en los fibroblastos CLN2 y CLN3 en condiciones de alta proteólisis, que es cuando la autofagia es más activa. Para ello las células se incubaron con hidroetidina (HE) y con dihidrorrodamina-123 (DRh123). Estas moléculas forman productos fluorescentes con el radical superóxido y el peróxido de hidrógeno, respectivamente, que pueden detectarse mediante citometría de flujo.

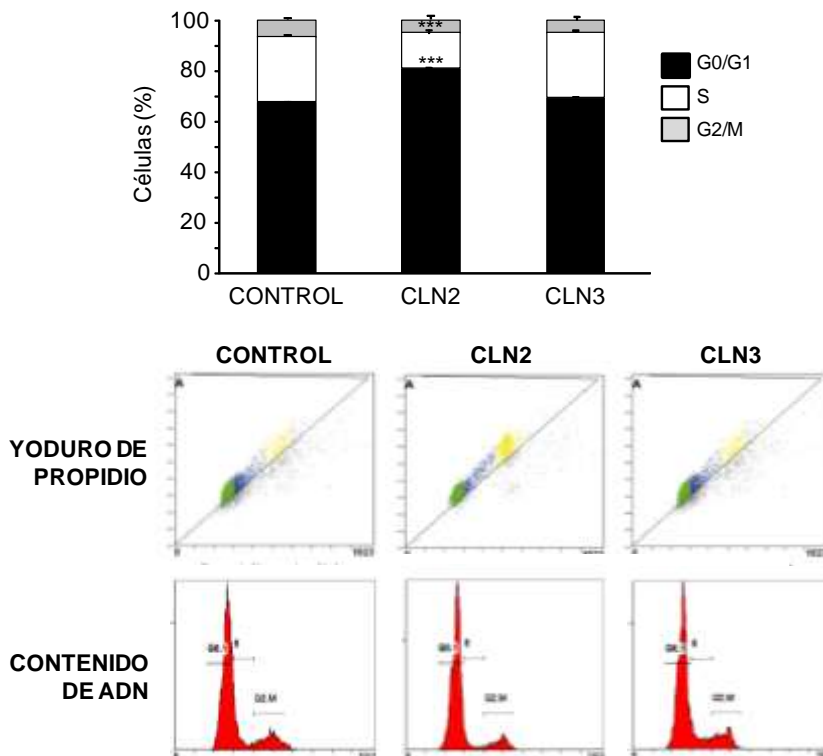


Figura 32. Los fibroblastos CLN2 se acumulan en la fase G₀/G₁. Para analizar la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 en crecimiento exponencial se cultivaron en medio completo y se incubaron con yoduro de propidio como se describe en el apartado de Metodología. Los resultados del histograma se refieren al porcentaje de células que se encuentra en las fases G₀/G₁, S y G₂/M del ciclo celular respecto del total y representan la media y la desviación típica de tres experimentos por separado con muestras por triplicado. También se muestran *dot-blots* representativos obtenidos en los ensayos de citometría para los fibroblastos control, CLN2 y CLN3. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles (***) $p < 0,005$.

Los resultados de la figura 33 muestran que tanto el radical superóxido como el peróxido de hidrógeno se encuentran aumentados de forma significativa en los fibroblastos CLN3 y, en mayor medida, en los CLN2, en comparación con los fibroblastos control.

Este aumento en los radicales libres, especialmente el del radical superóxido, sugiere una posible alteración en las mitocondrias en las células procedentes de pacientes. Para estudiar la funcionalidad mitocondrial se analizó tanto la morfología de las mitocondrias, utilizando MitoTracker Red, como el potencial

de membrana con TMRM. La acumulación de ambos fluoróforos en la mitocondria depende del potencial de membrana de la mitocondria.

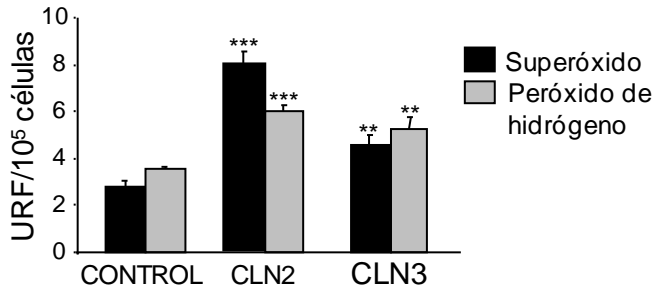


Figura 33. Los fibroblastos CLN2 y CLN3 presentan mayores niveles de radicales superóxido y peróxido de hidrógeno que los fibroblastos control. Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron en condiciones de alta proteólisis con HE o DRh123 y las células se analizaron mediante citometría de flujo para detectar, respectivamente, radicales superóxido y peróxido de hidrógeno tal como se describe en Metodología. Los resultados expresados como URF en 10^5 células, representan la media y la desviación típica de tres experimentos separados con muestras por triplicado. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas respecto de los respectivos valores control (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$).

Los resultados que se muestran en la figura 34 indican que no se observaron diferencias significativas ni a nivel de la morfología mitocondrial (A) ni a nivel del potencial de membrana (B) en ninguna de las dos condiciones estudiadas (alta y baja proteólisis) entre las células control y las procedentes de pacientes con lipofuscinosis ceroida neuronal. Por tanto, al contrario de lo que cabría esperar, el aumento en los niveles celulares de ROS no es consecuencia de la alteración de las mitocondrias.

Aunque clásicamente se ha situado a la mitocondria como el centro del metabolismo de ROS y del estrés oxidativo, también los peroxisomas están claramente relacionados, ya que estos orgánulos poseen una elevada concentración de oxidasas que generan peróxido de hidrógeno, y porque también contienen diferentes enzimas antioxidantes, en especial la catalasa. Por ello se analizó la actividad catalasa en las células CLN2 y CLN3 en comparación con los fibroblastos control. Los resultados muestran un descenso significativo en la actividad catalasa en los fibroblastos CLN2 pero no en los CLN3 (figura 35). Ese descenso en la actividad no se debe a unos

menores niveles de proteína, tal como se observa en el *Western-blot*, ya que son similares en todas las líneas celulares.

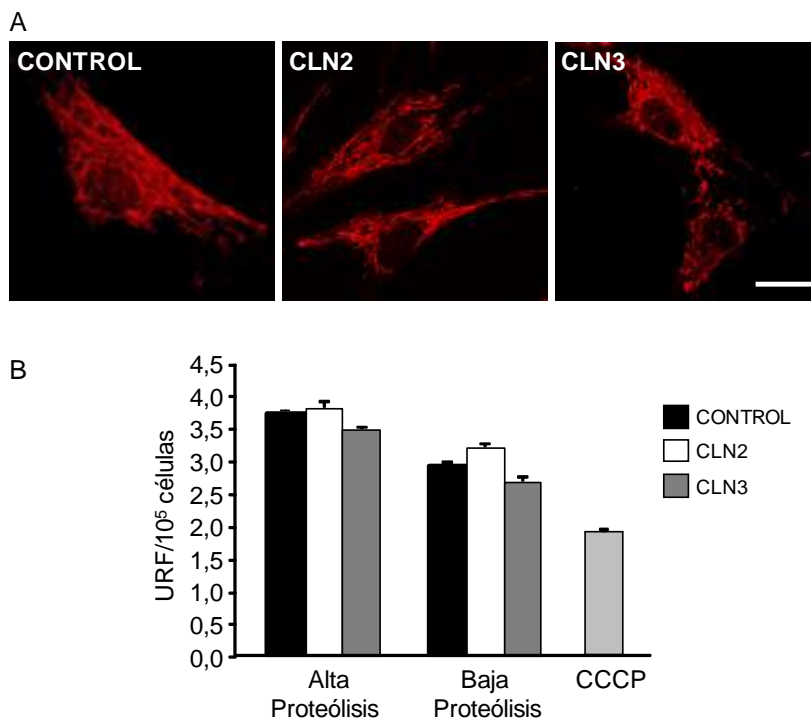


Figura 34. Las mitocondrias de los fibroblastos CLN2 y CLN3 no se encuentran significativamente alteradas. A) Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia de los fibroblastos control, CLN2 y CLN3. Tal como se describe en Metodología, las células se crecieron sobre cubreobjetos, se incubaron en condiciones de alta y baja proteólisis durante 2 h y con MitoTracker Red 75 nM durante 15 min, en ambos casos a 37 °C. A continuación, se fijaron con PFA 4 %/PBS durante 15 min a 37 °C y se montaron utilizando el reactivo Fluor-Save. Las imágenes que se muestran se tomaron en condiciones de alta proteólisis. B) Los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 se incubaron en condiciones de alta o baja proteólisis durante 2 h, tras lo que se incubaron 30 min con TMRM 100 nM, analizándose a continuación mediante citometría de flujo tal como se describe en Metodología. Como control se utilizó CCCP 20 μ M, que despolariza la membrana mitocondrial. Los resultados, expresados como URF en 10^5 células, representan la media y la desviación típica de tres experimentos independientes con muestras por triplicado. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos. Barra: 20 μ m.

Esta menor actividad de la enzima catalasa en los fibroblastos CLN2 y no en los CLN3 supone otra diferencia que contribuiría a explicar la aparición más temprana de la enfermedad en los pacientes de LINCL. Además, se sabe que la lipofuscina puede generar ROS, especialmente por fotoactivación. Por eso, la disfunción de la retina se ha asociado con la fotoactivación de

lipofuscina que conduce a la pérdida de la visión al liberar ROS que dañan a los lípidos, proteínas, DNA y finalmente a toda la célula, produciendo así la pérdida de visión (Boulton *et al.*, 2004). En ese sentido, conviene recordar (ver Introducción general) que una de las manifestaciones típicas de las lipofuscinoses ceroides neuronales es la pérdida de visión por degeneración retiniana. Por tanto, puesto que la lipofuscina puede generar ROS, la ausencia total de actividad TPP1 puede contribuir a una mayor o más rápida acumulación de lipofuscina en los lisosomas de los fibroblastos CLN2. Esto podría explicar la presencia de mayores niveles de ROS que, a su vez, alterarían el ciclo celular.

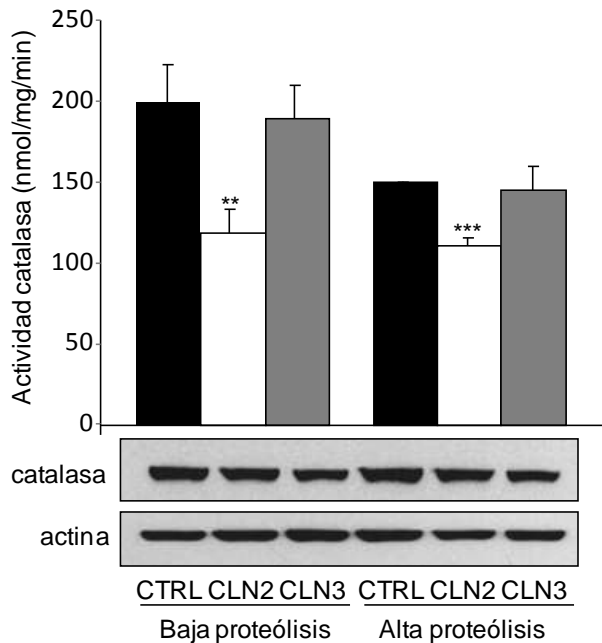


Figura 35. Los fibroblastos CLN2 presentan una actividad catalasa menor que los fibroblastos control. Los fibroblastos control (CTRL), CLN2 y CLN3 se incubaron en condiciones de baja o alta proteólisis durante 3 h. La actividad catalasa se midió tal y como se describe en el apartado de Metodología. Se representa la media y la desviación típica de los valores de actividad de la catalasa procedentes de tres experimentos independientes. Los asteriscos del panel inferior indican las diferencias estadísticamente significativas respecto a sus respectivos valores control en condiciones de baja o alta proteólisis (** $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$). Los extractos preclarificados (50 μg de proteína) de los fibroblastos control, CLN2 y CLN3 en condiciones de baja o alta proteólisis se analizaron mediante *Western-blot* utilizando anticuerpos frente a la catalasa y frente a la actina como control de carga (panel inferior).

3.4.2. Alteraciones en el transporte de enzimas lisosomales

Las enzimas lisosomales se transportan desde la red *trans* del Golgi (TGN) hasta los lisosomas, principalmente mediante el receptor de la manosa 6-fosfato independiente de cationes (CI-MPR). A continuación, este receptor se recicla a través del retrómero, llevándolo de vuelta al TGN para iniciar un nuevo ciclo. El pH lisosomal puede influir tanto en el transporte de las enzimas hidrolíticas hasta los lisosomas, afectando a su separación del receptor, como también en la degradación del propio receptor y en la maduración en el interior de los lisosomas de las enzimas transportadas. Puesto que solamente hemos observado un aumento en el pH lisosomal en los fibroblastos CLN3, hemos analizado estos procesos en esta línea celular comparándola con los fibroblastos control.

3.4.2.1. CI-MPR

En el complejo de Golgi, las hidrolasas ácidas solubles sufren un proceso de modificación con residuos de manosa 6-fosfato. Los receptores de manosa 6-fosfato, principalmente el CI-MPR, reconocen estos residuos y transportan las enzimas hacia el sistema endosomal/lisosomal (Brulke, 2009).

Para averiguar cómo funcionaba este transporte de las enzimas lisosomales en los fibroblastos CLN3, cuyo pH lisosomal es más alto, estudiamos la degradación del CI-MPR en medio de alta o baja proteólisis, en presencia o ausencia de cicloheximida (CHX).

Los resultados de la figura 36 muestran que la degradación del CI-MPR se encuentra disminuida de forma significativa en los fibroblastos CLN3 en comparación con las células control, lo que sugiere que el transporte de las enzimas lisosomales desde el TGN hasta los endosomas se encuentra alterado. Esto puede explicarse como consecuencia del aumento de pH en estas células CLN3, que afecta a los procesos de fusión con los endosomas de las vesículas que contienen al CI-MPR con su carga.

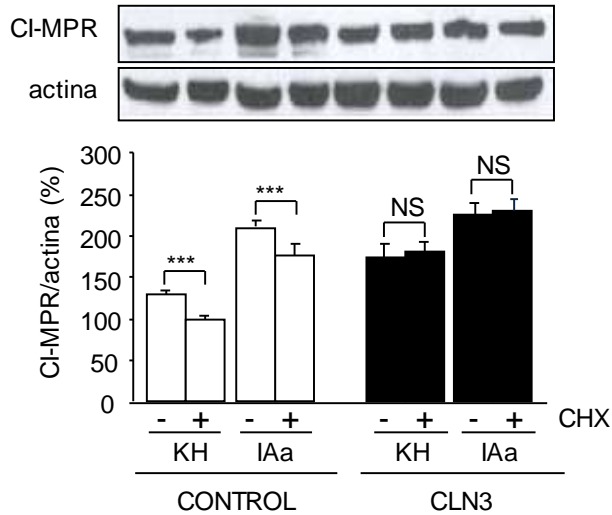


Figura 36. Los fibroblastos CLN3 presentan una menor degradación del CI-MPR en comparación con los fibroblastos control. Los fibroblastos control y CLN3 se incubaron en condiciones de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis en presencia o en ausencia de CHX 100 µg/ml durante 6 h. Los extractos totales se analizaron mediante *Western-blot* con anti-CI-MPR usando la actina como control de carga. Las bandas, cuantificadas mediante densitometría, se normalizaron frente a la actina. En la parte superior se muestran geles representativos. El histograma indica la media y desviación típica de tres experimentos independientes con muestras por triplicado de la relación entre los niveles de CI-MPR y de actina. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas en la degradación del receptor calculada como diferencia de los niveles del mismo en presencia y en ausencia de CHX (**p<0,005). Los casos en los que no existieron diferencias significativas se indican con NS (no significativo).

3.4.2.2. Retrómero

Una vez que el CI-MPR llega a los endosomas se recicla mediante el retrómero, que lo transporta desde los endosomas de nuevo hasta el TGN para cerrar el ciclo y volver a transportar enzimas lisosomales (Arighi *et al.*, 2004; Pfeffer, 2009; Seaman, 2004). Puesto que encontramos que la degradación de CI-MPR se encuentra disminuida en los fibroblastos CLN3, analizamos también la degradación de diversas proteínas (las hVps y las SNX) que forman los dos subcomplejos del retrómero para estudiar la existencia de posibles alteraciones en el reciclaje del receptor.

Los resultados de la figura 37 muestran, al igual que ocurría con el CI-MPR, una disminución en la degradación tanto de las subunidades hVps26 y hVps35 como de las SNX1 y SNX2 en los fibroblastos CLN3 en

comparación con las células control cuando se trataron en condiciones de alta o baja proteólisis. Por tanto, el reciclaje del CI-MPR hacia el TGN también se encuentra alterado.

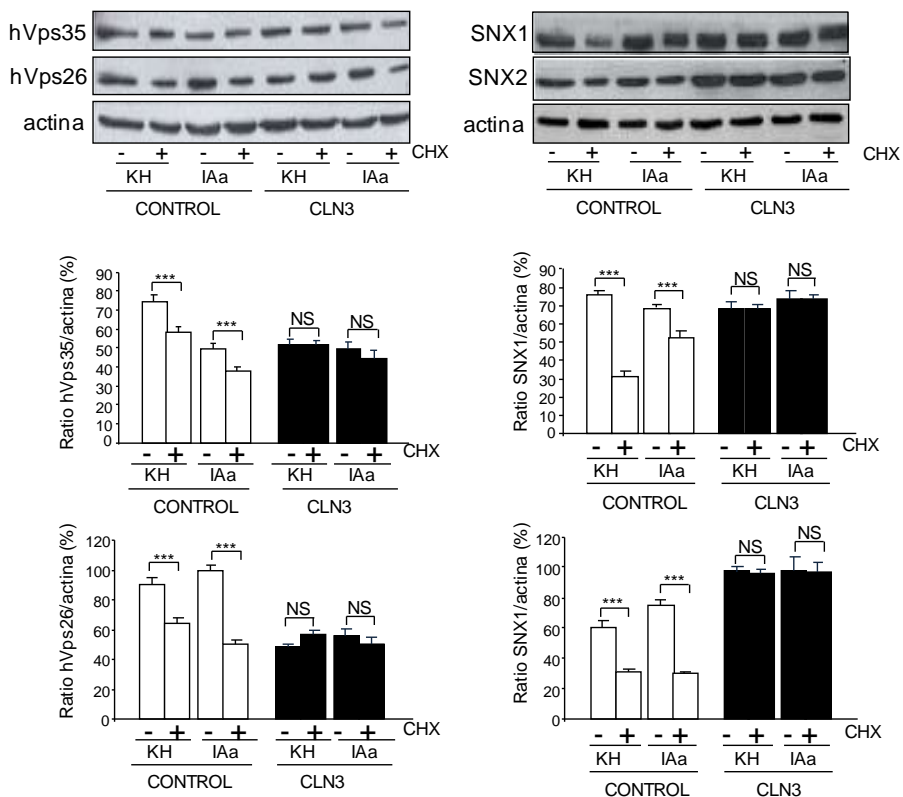


Figura 37. Los fibroblastos CLN3 presentan una menor degradación de los componentes del retrómero en comparación con los fibroblastos control. Los fibroblastos control y CLN3 se incubaron en condiciones de alta (KH) o baja (IAa) proteólisis en presencia de cicloheximida (CHX, 100 µg/ml) durante 6 h. Los extractos totales se analizaron mediante *Western-blot* con anti-hVps35, anti-hVps26, anti-SNX1 y anti-SNX2. La actina se usó como control de carga y las bandas se cuantificaron mediante densitometría, normalizándose frente a la actina. En la parte superior se muestran geles representativos y los histogramas de la parte inferior indican las correspondientes relaciones entre los niveles de las proteínas estudiadas y la actina. Los asteriscos indican las diferencias estadísticamente significativas en la degradación de los componentes del retrómero estudiados, calculada como diferencia de los niveles de dichas proteínas en presencia y en ausencia de CHX (***) $p < 0,005$). Los casos en los que no existieron diferencias significativas se indican con NS (no significativo).

Tomando en conjunto la menor degradación del CI-MPR y del retrómero, los datos sugieren que en los fibroblastos CLN3 el CI-MPR llegaría a los endosomas desde el TGN, donde no se degradaría, posiblemente como

consecuencia del aumento en el pH en estas células. Por tanto, el CI-MPR se estaría reciclando constantemente hacia el TGN a través del retrómero.

Para corroborar estos resultados, comparamos la localización del CI-MPR con la de la proteína TGN38, cuya función se desconoce y que se localiza en el TGN (Banting & Ponnambalam, 1997; Pfeffer, 2009). Tanto CI-MPR como TGN38 son proteínas transmembrana que viajan desde el TGN hasta los endosomas tempranos, para luego reciclarse de nuevo hacia el TGN y cerrar el ciclo (Lieu *et al.*, 2007).

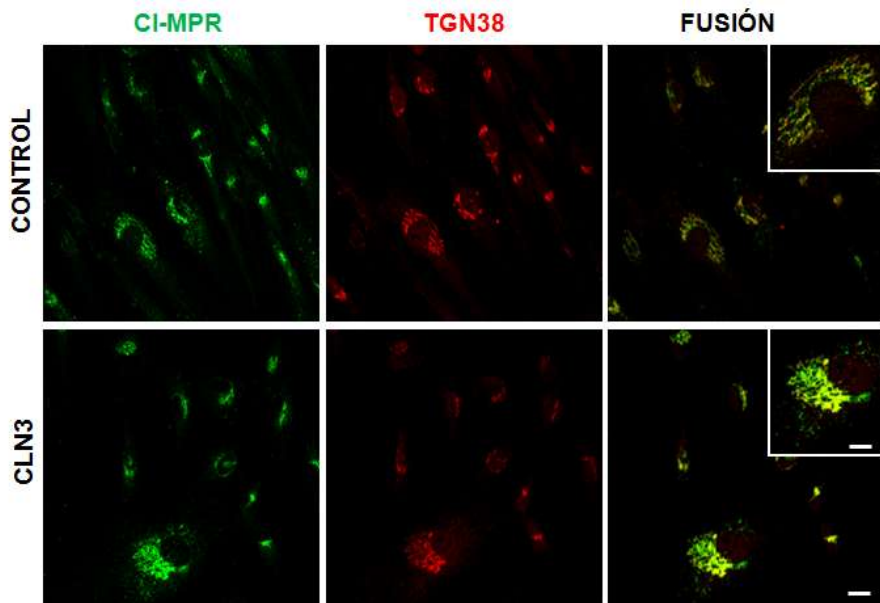


Figura 38. El CI-MPR colocaliza más con el TGN en los fibroblastos CLN3 en comparación con los fibroblastos control. Los fibroblastos control y CLN3 se incubaron a 37 °C en condiciones de alta proteólisis, se fijaron y se ensayaron frente a anti-CI-MPR y anti-TGN38 en presencia de inhibidores lisosomales, tal y como se describe en Metodología. En la figura se muestran imágenes representativas de las fluorescencias por separado y de la fusión de los dos canales. Barra: 40 μ m. Las ampliaciones muestran las células con un mayor aumento. Barra: 20 μ m,

Los resultados de la figura 38 muestran una mayor colocalización de TGN38 y CI-MPR en los fibroblastos CLN3 en comparación con las células control. Esto sugiere un aumento en el reciclaje del CI-MPR hacia el TGN por parte del retrómero como consecuencia del aumento del pH lisosomal en los

fibroblastos CLN3. Por tanto, este mayor pH puede retrasar la degradación del CI-MPR, haciendo que se recicle constantemente y colocalice más en el TGN.

3.4.2.3. Procesamiento de las enzimas lisosomales

Los resultados mostrados indican que el transporte de las enzimas lisosomales hasta los lisosomas puede estar disminuido en los fibroblastos CLN3 debido a que el aumento en el pH lisosomal es capaz de dificultar la fusión de las vesículas que permite la llegada de CI-MPR hasta los endosomas y la disociación del complejo enzima-receptor, lo que provoca un reciclaje constante de CI-MPR. Puesto que el pH lisosomal también puede influir en los procesos de maduración de las enzimas lisosomales para dar lugar a las formas activas de las mismas, analizamos el procesamiento de las procatepsinas L y D a sus correspondientes formas maduras en los fibroblastos control y CLN3 en condiciones de alta proteólisis, a fin de observar posibles diferencias.

Los resultados que se muestran en la figura 39 indican que en los fibroblastos CLN3 existe una menor conversión de las procatepsinas, especialmente de la procatepsina L, a sus correspondientes formas maduras, catepsina L y catepsina D, al analizar los niveles de estas dos proteínas mediante *Western-blot*.

La catepsina D participa en la degradación de la subunidad c de la ATP-sintasa mitocondrial, que se acumula en los fibroblastos CLN3 (Kominami, 2002). Además, a la catepsina L también se la ha localizado de manera reciente en vesículas secretoras que contienen neuropéptidos, y se ha visto que desempeña un papel esencial en la producción de neurotransmisores peptídicos (Hook *et al.*, 2012). Por tanto, el cambio en el pH registrado en estas células contribuye a la acumulación de la subunidad c de la ATP-sintasa, reduciendo por un lado la actividad de la enzima TPP1, como hemos visto anteriormente y alterando también el procesamiento de la

procatepsina D, ya que ambas enzimas intervienen en la degradación de esta subunidad de la ATP-sintasa (Koike *et al.*, 2000).

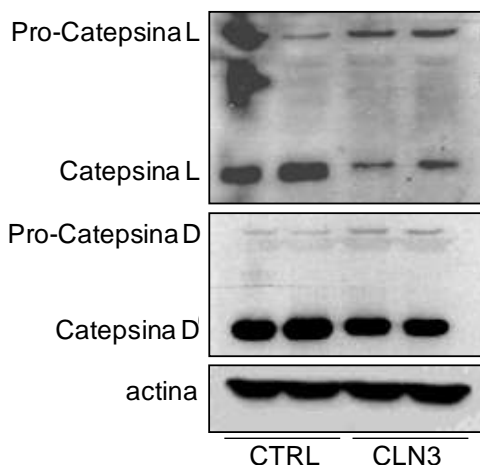


Figura 39. El procesamiento de las procatepsinas L y D a sus correspondientes formas maduras, catepsina L y D, se encuentra disminuido en los fibroblastos CLN3. Los fibroblastos control (CTRL) y CLN3 se incubaron por duplicado en medio de alta proteólisis durante 6 h. Los extractos totales se ensayaron mediante *Western-blot* con anticuerpos frente a las formas precursora y madura de las catepsinas L y D, utilizando actina como control de carga. Se muestran geles representativos.

Así pues, en los fibroblastos CLN2 la deficiencia en la TPP1 originaría las alteraciones observadas en la función lisosomal, especialmente en la macroautofagia. En los fibroblastos CLN3, el cambio en el pH se presenta como una alteración que desencadenaría la misma patología que en los fibroblastos CLN2, con alteraciones en la macroautofagia, en el transporte y reciclaje de receptores y en el transporte de las enzimas lisosomales, aunque con unos efectos menos pronunciados, que explicarían una edad de aparición posterior en la variante juvenil.

Asimismo, la presencia de mayores niveles de ROS en los fibroblastos CLN2 como consecuencia de la alteración de la macroautofagia puede explicar el aumento en la fosforilación de las quinasas p38 α y ERK1/2 descrito anteriormente (ver figura 22). En relación con esto, se sabe que p38 α se activa en respuesta a niveles elevados de ROS en la célula (Luo *et al.*, 2011; Sato *et al.*, 2014; Wu & Cederbaum, 2013) y que, aunque ERK1/2

se activa sobre todo en respuesta a factores de crecimiento (Cheng *et al.*, 2013), en determinadas circunstancias también puede hacerlo en presencia de altos niveles de ROS (Yan *et al.*, 2012). Aunque existen estudios en los que se muestra un efecto activador sobre la autofagia por parte de las ROS a través de p38 α y ERK1/2 (Liu *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2012), los resultados que presentamos en este trabajo apoyarían un papel de ROS como inhibidoras de la autofagia, también observado por otros autores (Li *et al.*, 2011). Es posible que inicialmente las ROS desencadenen un incremento en la autofagia, pero que posteriormente afecten al propio proceso autofágico, inhibiéndolo. También es posible que el efecto activador o inhibidor dependa de los niveles de ROS que se alcanzan en las células. En cualquier caso, parece que en las lipofuscinosis ceroides neuronales, las ROS, junto a otros estimuladores de la vía Akt-mTOR, podrían actuar coordinadamente para inhibir la autofagia.

Por tanto, la mayor reducción en la actividad de la enzima TPP1 en LINCL, junto con la reducción en la actividad catalasa, contribuirán a un mayor aumento en la formación de ROS. Esta mayor formación de ROS en LINCL podría alterar la regulación de la macroautofagia, probablemente afectando a las vías de señalización que regulan esta vía degradativa. Así pues, todas estas diferencias podrían explicar la diferente gravedad de las dos variantes de la enfermedad.

CONCLUSIONES FINALES

4. CONCLUSIONES FINALES

Las principales conclusiones obtenidas en este trabajo han sido:

1. De las dos principales vías de degradación intracelular de proteínas, solo la macroautofagia es defectuosa en las líneas celulares de pacientes con lipofuscinosis ceroides neuronales infantil tardía (CLN2) y juvenil (CLN3). En cuanto a las principales vías endocíticas estudiadas, solo la macropinocitosis está reducida en ambas líneas de pacientes.
2. En los fibroblastos de pacientes se produce una menor formación de autofagosomas que coincide con una mayor activación de la vía Akt-mTOR, especialmente en los fibroblastos CLN2.
3. En los fibroblastos CLN3, el pH lisosomal es mayor en aproximadamente 0,5 unidades que en los fibroblastos control o CLN2. Como consecuencia de esto, la maduración de autofagosomas, el transporte vesicular y la maduración de las enzimas lisosomales están disminuidos en aquellas células. Asimismo, la actividad de la enzima TPP1, cuyo pH óptimo es muy ácido, disminuye en aproximadamente un 60 % en los fibroblastos CLN3 en comparación con los controles.
4. En los fibroblastos CLN2 están más activadas las quinasas p38 α y ERK1/2, son mayores los niveles de ROS y es menor la actividad de la catalasa en comparación con los fibroblastos control o CLN3. Esto, junto a la prácticamente total ausencia de la actividad de TPP1, podría explicar la aparición más temprana de la sintomatología en la variante infantil tardía.

BIBLIOGRAFÍA

5. BIBLIOGRAFÍA

Agarraberes FA, Dice JF (2001) A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J Cell Sci* 114, 2491-2499.

Ahmed Z, Sheng H, Xu Y, Lin W, Innes AE, Gass J, Yu X, Hou H, Chiba S, Yamanouchi K, Leissring M, Petrucelli L, Nishihara M, Hutton ML, McGowan E, Dickson DW, Lewis J (2010) Accelerated Lipofuscinosis and Ubiquitination in Granulin Knockout Mice Suggest a Role for Progranulin in Successful Aging. *Am J Pathol* 177, 2145-2146.

Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, Stork B (2012) Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Mol Cell Biol* 32, 2-11.

Amm I, Sommer T, Wolf DH (2014) Protein quality control and elimination of protein waste: the role of the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta* 1843, 182-196.

Anderson GW, Goebel HH, Simonati A (2013) Human pathology in NCL. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1807-1826.

Arighi CN, Hartnell LM, Aguilar RC, Haft CR, Bonifacino JS (2004) Role of the mammalian retromer in sorting of the cation-independent mannose 6-phosphate receptor. *J Cell Biol* 165, 123-133.

Azarashvili T, Odinkova I, Bakunts A, Ternovsky V, Krestinina O, Tyynelä J, Saris NE (2014) Potential role of subunit c of F0F1-ATPase and subunit c of storage body in the mitochondrial permeability transition. Effect of the phosphorylation status of subunit c on pore opening. *Cell Calcium* 55, 69-77.

Babacan-Yildiz G, Hanagasi H, Gurvit H, Sirin G, Solakoglu S, Kucuk OS (2012) A rare dementing disease: adult neuronal ceroid lipofuscinoses. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 24, 493-498.

Bader N, Jung T, Grune T (2007) The proteasome and its role in nuclear protein maintenance. *Exp Gerontol* 42, 864-870.

Ballabio A, Gieselmann V (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta* 1793, 684-696.

Bampton E, Goemans C, Niranjana D, Mizushima N, Tolkovsky A (2005) The dynamics of autophagy visualized in live cells. *Autophagy* 1, 23-26.

Banting G, Ponnambalam S (1997) TGN38 and its orthologues: roles in post-TGN vesicle formation and maintenance of TGN morphology. *Biochim Biophys Acta* 1355, 209-217.

Bejarano E, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy. *Proc Am Thorac Soc* 7, 29-39.

Bellettato CM, Scarpa M (2010) Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders. *J Inherit Metab Dis* 33, 347-362.

Benbrook DM, Long A (2012) Integration of autophagy, proteasomal degradation, unfolded protein response and apoptosis. *Exp Oncol* 34, 286-397.

Beugnet A, Tee AR, Taylor PM, Proud CG (2003) Regulation of targets of mTOR signaling by intracellular amino acids availability. *Biochem J* 372, 555-566.

Bezprozvanny I (2009) Calcium signaling and neurodegenerative diseases. *Trends Mol Med* 15, 89-100.

Bohdanowicz M, Grinstein S (2013) Role of phospholipids in endocytosis, phagocytosis, and macropinocytosis. *Physiol Rev* 93, 69-106.

Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B, Wess T (2004) The photoreactivity of ocular lipofuscin. *Photochem Photobiol Sci* 3, 759-764.

Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* 15, 713-720.

Braulke T, Bonifacino JS (2009) Sorting of lysosomal proteins. *Biochim Biophys Acta* 1793, 605-614.

Brooks P, Fuertes G, Murray RZ, Bose S, Knecht E, Rechsteiner MC, Hendil KB, Tanaka K, Dyson J, Rivett J (2000) Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J* 346, 155-161.

Bulteau AL, Bayot A (2011) Mitochondrial proteases and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1807, 595-601.

Burgdorf S, Kurts C (2008) Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 20, 89-95.

Byfield MP, Murray JT, Backer JM (2005) hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem* 280, 33076-33082.

Cao Y, Espinola JA, Fossale E, Massey AC, Cuervo AM, MacDonald ME, Cotman SL (2006) Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 281, 20483-20493.

Cao Y, Staropoli JF, Biswas S, Espinola JA, Macdonald ME, Lee JM, Cotman SL (2011) Distinct early molecular responses to mutations causing vLINCL and JNCL presage ATP synthase subunit C accumulation in cerebellar cells. *PLoS One* 6, e17118.

Carlén B, Englund E (2001) Diagnostic value of electron microscopy in a case of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Ultrastruct Pathol* 25, 285-288.

Carlton JG, Bujny MV, Peter BJ, Oorschot VM, Rutherford A, Arkell RS, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ (2005) Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. *J Cell Sci* 118, 4527-4539.

Carver LA, Schnitzer J E (2003) Caveolae: mining little caves for new cancer targets. *Nat Rev Cancer* 3, 571-581.

Carvou N, Norden AG, Unwin RJ, Cockcroft S (2007) Signalling through phospholipase C interferes with clathrin-mediated endocytosis. *Cell Signal* 19, 42-51.

Casas-Terradellas E, Tato I, Bartrons R, Ventura F, Rosa JL (2008) ERK and p38 pathways regulate amino acid signalling. *Biochim Biophys Acta* 1783, 2241-2254.

Chattopadhyay S, Muzaffar NE, Sherman F, Pearce DA (2000) The yeast model for Batten disease: mutations in *BTN1*, *BTN2*, and *HSP30* alter pH homeostasis. *J Bacteriol* 182, 6418-6423.

Chen G, Qiu H, Ke S, Hu S, Yu S, Zou S (2013) The fibroblast growth factor receptor 2-mediated extracellular signal-regulated kinase 1/2 signaling pathway plays an important role in regulating excision repair cross-complementary gene 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Biomed Rep* 1, 604-608.

Chen J, Fang Y (2002) A novel pathway regulating the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling. *Biochem Pharmacol* 64, 1071-1077.

Cheng SW, Fryer LG, Carling D, Shepherd PR (2004) Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status. *J Biol Chem* 279, 15719-15722.

Cheng Y, Qiu F, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T (2008) ERK and JNK mediate TNF α -induced p53 activation in apoptotic and autophagic L929 cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 376, 483-488.

Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40, 427-446.

Ciechanover A (2012) Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Biochim Biophys Acta* 1824, 3-13.

Cotman SL, Vrbanac V, Lebel LA, Lee RL, Johnson KA, Donahue LR, Teed AM, Antonellis K, Bronson RT, Lerner TJ, MacDonald ME (2002) Cln3(Deltaex7/8) knock-in mice with the common JNCL mutation exhibit progressive neurologic disease that begins before birth. *Hum Mol Genet* 11, 2709-2721.

Coux O, Tanaka K, Goldberg AL (1996) Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-847.

Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol* 14, 70-77.

Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy: Dice's 'wild' idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 535-541.

Cullen, PJ (2008) Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 574-582.

Curcio-Morelli C, Charles FA, Micsenyi MC, Cao Y, Venugopal B, Browning MF, Dobrenis K, Cotman SL, Walkley SU, Slaugenhaupt SA (2010) Macroautophagy is defective in mucolipin-1-deficient mouse neurons. *Neurobiol Dis* 40, 370-377.

Cury GK, Matte U, Artigalás O, Alegria T, Velho RV, Sperb F, Burin MG, Ribeiro EM, Lourenço CM, Kim CA, Valadares ER, Galera MF, Acosta AX, Schwartz IV (2013) Mucopolidosis II and III alpha/beta in Brazil: analysis of the GNPTAB gene. *Gene* 524, 59-64.

Czaja MJ (2011) Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and disease. *Gastroenterology* 140, 1895-1908.

Damme M, Brandenstein L, Fehr S, Jankowiak W, Bartsch U, Schweizer M, Hermans-Borgmeyer I, Storch S (2014) Gene disruption of Mfsd8 in mice provides the first animal model for CLN7 disease. *Neurobiol Dis* 65, 12-24.

Dean RT (1980) Protein degradation in cell cultures: general considerations on mechanisms and regulation. *Fed Proc* 39, 15-19.

Dennissen FJ, Kholod N, van Leeuwen FW (2012) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: culprit, accomplice or victim? *Prog Neurobiol* 96, 190-207.

Dharmawardhane S, Schurmann A, Sells MA, Chernoff J, Schmid SL, Bokoch GM (2000) Regulation of macropinocytosis by p21-activated kinase-1. *Mol Biol Cell* 11, 3341-3352.

Dice JF (2007) Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy* 3, 295-299.

Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of Endocytosis. *Annu Rev Biochem* 78, 857-902.

Donaldson JG, Porat-Shliom N, Cohen LA (2009) Clathrin-independent endocytosis: a unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell Signal* 21, 1-6.

Dong H, Czaja MJ (2011) Regulation of lipid droplets by autophagy. *Trends Endocrinol Metab* 22, 234-240.

Dou Z, Pan JA, Dbouk HA, Ballou LM, DeLeon JL, Fan Y, Chen JS, Liang Z, Li G, Backer JM, Lin RZ, Zong WX (2013) Class IA PI3K p110 β subunit promotes autophagy through Rab5 small GTPase in response to growth factor limitation. *Mol Cell* 50, 29-42.

Dowrick P, Kenworthy P, McCann B, Warn R (1993) Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur J Cell Biol* 61, 44-53.

Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, Kawamori R, Fujitani Y, Watada H (2008) Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab* 8, 325-332.

Eisele F, Wolf DH (2008) Degradation of misfolded protein in the cytoplasm is mediated by the ubiquitin ligase Ubr1. *FEBS Lett* 582, 4143-4146.

Eskelinen EL, Schmidt CK, Neu S, Willenborg M, Fuertes G, Salvador N, Tanaka Y, Lüllmann-Rauch R, Hartmann D, Heeren J, von Figura K, Knecht E, Saftig P (2004) Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15, 3132-3145.

Esteban I, Aguado C, Sánchez M, Knecht E (2007) Regulation of various proteolytic pathways by insulin and amino acids in human fibroblasts. *FEBS Lett* 581, 3415-3421.

Esteve JM, Armengod ME, Knecht E (2010) BRCA1 negatively regulates formation of autophagic vacuoles in MCF-7 breast cancer cells. *Exp Cell Res* 316, 2618-2629.

Esteve JM, Knecht E (2011) Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells. *World J Biol Chem* 2, 232-238.

Falcone S, Cocucci, E, Podini, P, Kirchhausen, T, Clementi, E, Meldolesi, J (2006) Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J Cell Sci* 119, 4758-4769.

Ferreira F, Foley M, Cooke A, Cunningham M, Smith G, Woolley R, Henderson G, Kelly E, Mundell S, Smythe E (2012) Endocytosis of G protein-coupled receptors is regulated by clathrin light chain phosphorylation. *Curr Biol* 22, 1361-1370.

Filippon L, Vanzin CS, Biancini GB, Pereira IN, Manfredini V, Sitta A, Peralba Mdo C, Schwartz IV, Giugliani R, Vargas CR (2011) Oxidative stress in patients with mucopolysaccharidosis type II before and during enzyme replacement therapy. *Mol Genet Metab* 103, 121-127.

Finn R, Kovács AD, Pearce DA (2011) Altered sensitivity of cerebellar granule cells to glutamate receptor overactivation in the *Cln3(Δex7/8)*-knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurochem Int* 58, 648-655.

Fisher JS, Ju JS, Oppelt PJ, Smith JL, Suzuki A, Esumi H (2005) Muscle contractions, AICAR and insulin cause phosphorylation of an AMPK-related kinase. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289, E986-E992.

Fossale E, Wolf P, Espinola JA, Lubicz-Nawrocka T, Teed AM, Gao H, Rigamonti D, Cattaneo E, MacDonald ME, Cotman SL (2004) Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *BMC Neurosci* 5, 57-70.

Fritchie K, Siintola E, Armao D, Lehesjoki AE, Marino T, Powell C, Tennison M, Booker JM, Koch S, Partanen S, Suzuki K, Tynnelä J, Thorne LB (2009) Novel mutation and the first prenatal screening of cathepsin D deficiency (CLN10). *Acta Neuropathol* 117, 201-208.

Fu R, Yanjanin NM, Bianconi S, Pavan WJ, Porter FD (2010) Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C. *Mol Genet Metab* 101, 214-218.

Fuertes G, Villarroya A, Knecht E (2003a) Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol* 35, 651-664.

Fuertes G, Martín De Llano JJ, Villarroya A, Rivett AJ, Knecht E (2003b) Changes in the proteolytic activities of proteasomes and lysosomes in human fibroblasts produced by serum withdrawal, amino-acid deprivation and confluent conditions. *Biochem J* 375, 75-86.

Futerman AH, van Meer G (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 554-565.

Galizzi G, Russo D, Deidda I, Cascio C, Passantino R, Guarneri R, Bigini P, Mennini T, Drago G, Guarneri P (2011) Different early ER-stress responses in the CLN8(mnd) mouse model of neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurosci Lett* 488, 258-262.

Gao YS, Hubbert CC, Yao TP (2010) The microtubule-associated histone deacetylase 6 (HDAC6) regulates epidermal growth factor receptor (EGFR) endocytic trafficking and degradation. *J Biol Chem* 285, 11219-11226.

García-Giménez JL, Seco-Cervera M, Aguado C, Romá-Mateo C, Dasí F, Priego S, Markovic J, Knecht E, Sanz P, Pallardó FV (2013) Lafora disease fibroblasts exemplify the molecular interdependence between thioredoxin 1 and the proteasome in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 65, 347-359.

Garg S, Timm T, Mandelkow EM, Mandelkow E, Wang Y (2011) Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment. *Neurobiol Aging* 32, 1-14.

Gerber HP, Koehn FE, Abraham RT (2013) The antibody-drug conjugate: an enabling modality for natural product-based cancer therapeutics. *Nat Prod Rep* 30, 625-639.

Ghislat G, Aguado C, Knecht E (2012) Annexin A5 stimulates autophagy and inhibits endocytosis. *J Cell Sci* 125, 92-107.

Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E (2012) Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β). *J Biol Chem* 287, 38625-38636.

Ghislat G (2013) Regulation of lysosomal degradation by Ca⁺² and Ca⁺²-binding proteins. Tesis doctoral.

Gilbert A, Paccaud JP, Foti M, Porcheron G, Balz J, Carpentier JL (1999) Direct demonstration of the endocytic function of caveolae by a cell-free assay. *J Cell Sci* 112, 1101-1110.

Glaumann H (1989) Crinophagy as a means for degrading excess secretory proteins in rat liver. *Revis Biol Celular* 20, 97-110.

Glickman MH & Ciechanover A (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* 82, 373-428.

Goebel HH (1996) The neuronal ceroid-lipofuscinoses. *Semin Pediatr Neurol* 3, 270-278.

Golabek AA, Kida E, Walus M, Kaczmarek W, Michalewski M, Wisniewski KE (2000) CLN3 protein regulates lysosomal pH and alters intracellular processing of Alzheimer's amyloid-beta protein precursor and cathepsin D in human cells. *Mol Genet Metab* 70, 203-213.

Golabek AA, Kida E, Walus M, Wujek P, Mehta P, Wisniewski KE (2003) Biosynthesis, glycosylation, and enzymatic processing in vivo of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 278, 7135-7145.

Göstring L, Chew MT, Orlova A, Höidén-Guthenberg I, Wennborg A, Carlsson J, Frejd FY (2010) Quantification of internalization of EGFR-binding Affibody molecules: Methodological aspects. *Int J Oncol* 36, 757-763.

Gozuacik D & Kimchi A (2004) Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23, 2891-2906.

Griffin CT, Trejo J, Magnuson T (2005) Genetic evidence for a mammalian retromer complex containing sorting nexins 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 15173-15177.

Grimmer S, van Deurs B, Sandvig K (2002) Membrane ruffling and macropinocytosis in A431 cells require cholesterol. *J Cell Sci* 115, 2953-2962.

Grinde B, Seglen PO (1981) Effects of amino acids and amino acid analogues on lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Acta Biol Med Germ* 40, 1603-1612.

Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF (2005) Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie* 87, 99-109.

Guhaniyogi J, Sohar I, Das K, Stock AM, Lobel P (2009) Crystal structure and autoactivation pathway of the precursor form of human tripeptidyl-peptidase 1, the enzyme deficient in late infantile ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 284, 3985-3997.

Guo XL, Li D, Hu F, Song JR, Zhang SS, Deng WJ, Sun K, Zhao QD, Xie XQ, Song YJ, Wu MC, Wei LX (2012) Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 320, 171-179.

Haft CR, de la Luz Sierra M, Bafford R, Lesniak MA, Barr VA, Taylor SI (2000) Human orthologs of yeast vacuolar protein sorting proteins Vps26, 29, and 35: assembly into multimeric complexes. *Mol Biol Cell* 11, 4105-4116.

Haga Y, Miwa N, Jahangeer S, Okada T, Nakamura S (2009) CtBP1/BARS is an activator of phospholipase D1 necessary for agonist-induced macropinocytosis. *EMBO J* 28, 1197-1207.

Haltia M, Goebel HH (2013) The neuronal ceroid-lipofuscinoses: a historical introduction. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1795-1800.

Han JM, Jeong SJ, Park MC, Kim G, Kwon NH, Kim HK, Ha SH, Ryu SH, Kim S (2012) Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell* 149, 410-424.

Hartmann-Petersen R, Seeger M, Gordon C (2003) Transferring substrates to the 26S proteasome. *Trends Biochem Sci* 28, 26-31.

Hawkes C, Kar S (2004) The insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor: structure, distribution and function in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 44, 117-140.

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67, 425-479.

Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nature Med* 6, 1073-1081.

Hietakangas V, Cohen SM (2009) Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet* 43, 389-410.

Holopainen JM, Saarikoski J, Kinnunen PK, Järvelä I (2001) Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). *Eur J Biochem* 26, 5851-5856.

Holz MK, Blenis J (2005) Identification of S6 kinase 1 as a novel mammalian target of rapamycin (mTOR)-phosphorylating kinase. *J Biol Chem* 280, 26089-26093.

Hook V, Funkelstein L, Wegrzyn J, Bark S, Kindy M, Hook G (2012) Cysteine Cathepsins in the secretory vesicle produce active peptides:

Cathepsin L generates peptide neurotransmitters and cathepsin B produces beta-amyloid of Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1824, 89-104.

Hunker CM, Galvis A, Kruk I, Giambini H, Veisaga ML, Barbieri MA (2006) Rab5-activating protein 6, a novel endosomal protein with a role in endocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 967-975.

Jalanko A, Braulke T (2009) Neuronal ceroid lipofuscinoses. *Biochim Biophys Acta* 1793, 697-709.

Janes RW, Munroe PB, Mitchinson HM, Gardiner RM, Mole SE, Wallace BA (1996) A model for Batten disease protein CLN3: functional implications from homology and mutations. *FEBS Letters* 399, 75-77.

Jewell JL, Russell RC, Guan KL (2013) Amino acid signalling upstream of mTOR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 133-139.

Jeyaraju DV, Sood A, Laforce-Lavoie A, Pellegrini L (2013) Rhomboid proteases in mitochondria and plastids: keeping organelles in shape. *Biochim Biophys Acta* 1833, 371-380.

Jolly RD, Brown S, Das AM, Walkley SU (2002) Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Neurochem Int* 40, 565-571.

Jones AT (2007) Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *J Cell Mol Med* 11, 670-684.

Jousse C, Averous J, Bruhat A, Carraro V, Mordier S, Fafournoux P (2004) Amino acids as regulators of gene expression: molecular mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 447-452.

Junaid MA, Pullarkat RK (2001) Biochemistry of neuronal ceroid lipofuscinoses. *Adv Genet* 45, 93-106.

Jung CH, Ro SH, Cao J, Otto NM, Kim DH (2010) mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett* 584, 1287-1295.

Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, Nguyen YH, Kang TM, Yoon KH, Kim JW, Jeong YT, Han MS, Lee MK, Kim KW, Shin J, Lee MS (2008) Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab* 8, 318-324.

Jung T, Grune T (2013) The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part I—structure of proteasomes *Redox Biol* 1, 178-182.

Kadowaki M, Kanazawa T (2003) Amino acids as regulators of proteolysis. *J Nutr* 133, 2052S-2056S.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG (2005) AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab* 1, 15-25.

Kaminsky V, Zhivotovsky B (2012) Proteases in autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1824, 44-50.

Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yoshizawa F, Furuya N, Fujimura S, Kadowaki M (2003) Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 279, 8452-8459.

Katsanakis KD, Pillary TS (2005) Cross-talk between the two divergent insulin signaling pathways is revealed by the protein kinase B (AKT)-mediated phosphorylation of adapter protein APS on serine 588. *J Biol Chem* 280, 37827-37832.

Katz ML, Gao CL, Prabhakaram M, Shibuya H, Liu PC, Johnson GS (1997) Immunochemical localization of the Batten disease (CLN3) protein in retina. *Invest Ophthalmol Visual Sci* 38, 2375-2386.

Kerr MC, Teasdale RD (2009) Defining macropinocytosis. *Traffic* 10, 364-371.

Kida E, Kaczmarek W, Golabek AA, Kaczmarek A, Michalewski M, Wisniewski KE (1999) Analysis of intracellular distribution and trafficking of the CLN3 protein in fusion with the green fluorescent protein in vitro. *Mol Genet Metab* 66, 265-271.

Kielar C, Maddox L, Bible E, Pontikis CC, Macauley S, Griffey MA, Wong M, Sands MS, Cooper JD (2006) Successive neuronal loss in the thalamus and cortex in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Neurobiol Disease* 25, 150-162.

Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* 15, 4829-4840.

Kim Y, Ramirez-Montealegre D, Pearce DA (2003) A role in vacuolar arginine transport for yeast Btn1p and for human CLN3, the protein defective in Batten disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 15458-15462.

Kim Y, Chattopadhyay S, Locke S, Pearce DA (2005) Interaction among Btn1p, Btn2p, and Ist2p reveals potential interplay among the vacuole,

amino acid levels, and ion homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4, 281-288.

Kimura S, Noda T, Yoshimori T (2008) Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct* 33, 109-122.

Kisselev AF, Goldberg AL (2005) Monitoring activity and inhibition of 26S proteasomes with fluorogenic peptide substrates. *Methods Enzymol* 398, 364-378.

Klionsky, DJ (2004) Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature* 431, 31-32.

Klionsky DJ (2005) Autophagy. *Curr Biol* 15, 282-283.

Klionsky DJ *et al.*, (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151-175.

Klionsky DJ *et al.*, (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445-544.

Klionsky DJ, Codogno P (2013) The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* 5, 427-433.

Knecht E, Hernández-Yago J, Grisolia S (1984) Regulation of lysosomal autophagy in transformed and non-transformed mouse fibroblasts under several growth conditions. *Exp Cell Res* 154, 224-232.

Knecht E, Aguado C, Cárcel J, Esteban I, Esteve JM, Ghislat G, Moruno JF, Vidal JM, Sáez R (2009) Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell Mol Life Sci* 66, 2427-2443.

Knecht E, Aguado C, Sarkar S, Korolchuk VI, Criado-García O, Vernia S, Boya P, Sanz P, Rodríguez de Córdoba S, Rubinsztein DC (2010) Impaired autophagy in Lafora disease. *Autophagy* 6, 991-993.

Knecht E, Criado-García O, Aguado C, Gayarre J, Duran-Trio L, Garcia-Cabrero AM, Vernia S, San Millán B, Heredia M, Romá-Mateo C, Mouron S, Juana-López L, Domínguez M, Navarro C, Serratosa JM, Sanchez M, Sanz P, Bovolenta P, Rodríguez de Córdoba S (2012) Malin knockout mice support a primary role of autophagy in the pathogenesis of Lafora disease. *Autophagy* 8, 701-703.

Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392, 193-197.

Koike M, Nakanishi H, Saftig P, Ezaki J, Isahara K, Ohsawa Y, Schulz-Schaeffer W, Watanabe T, Waguri S, Kametaka S, Shibata M, Yamamoto K, Kominami E, Peters C, von Figura K, Uchiyama Y (2000) Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons. *J Neurosci* 20, 6898-6906.

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880-884.

Kominami AE (2002) What are the requirements for lysosomal degradation of subunit c of mitochondrial ATPase? *IUBMB Life* 54, 89-90.

Kornfeld S (1992) Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61, 307-330.

Kovács AD, Saje A, Wong A, Ramji S, Cooper JD, Pearce DA (2012) Age-dependent therapeutic effect of memantine in a mouse model of juvenile Batten disease. *Neuropharmacology* 63, 769-775.

Koval M, Preiter K, Adles C, Stahl PD, Steinberg TH (1998) Size of IgG-opsonized particles determines macrophage response during internalization. *Exp Cell Res* 242, 265-273.

Kremmidiotis G, Lensink IL, Bilton RL, Woollatt E, Chataway TK, Sutherland GR, Callen DF (1999) The Batten disease gene product (CLN3p) is a Golgi integral membrane protein. *Hum Mol Genet* 8, 523-531.

Kuang E, Qi J, Ronai Z (2013) Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem Sci* 38, 453-460.

Kuma A, Matsui M, Mizushima N (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy. *Autophagy* 4, 323-328.

Kunz JB, Schwarz H, Mayer A (2004) Determination of four sequential stages during microautophagy in vitro. *J Biol Chem* 279, 9987-9996.

Kyttälä A, Ihrke G, Vesa J, Schell MJ, Luzio JP (2004) Two motifs target Batten disease protein CLN3 to lysosomes in transfected nonneuronal and neuronal cells. *Mol Biol Cell* 15, 1313-1323.

Kyttälä A, Lahtinen U, Braulke T, Hoffman SL (2006) Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinosis (NCL) proteins. *Biochim Biophys Acta* 1762, 920-933.

Lauer S, Goldstein B, Nolan RL, Nolan JP (2002) Analysis of cholera toxin-ganglioside interactions by flow cytometry. *Biochemistry* 41, 1742-1751.

Lerner TJ, Boustany RN, Anderson JW, D'Arigo KL, Schlumpf K, Buckler AJ, Gusella JF, Haines JL (1995) Isolation of a novel gene underlying Batten disease, CLN3. *Cell* 82, 949-957.

Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6, 463-477.

Li L, Chen Y, Gibson SB (2013) Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal* 25, 50-65.

Li ZY, Yang Y, Ming M, Liu B (2011) Mitochondrial ROS generation for regulation of autophagic pathways in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 414, 5-8.

Lieu ZZ, Derby MC, Teasdale RD, Hart C, Gunn P, Gleeson PA (2007) The Golgin GCC88 Is Required for Efficient Retrograde Transport of Cargo from the Early Endosomes to the Trans-Golgi Network. *Mol Biol Cell* 18, 4979-4991.

Lin L, Sohar I, Lackland H, Lobel P (2001) The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem* 276, 2249-2255.

Liu SY, Chen CL, Yang TT, Huang WC, Hsieh CY, Shen WJ, Tsai TT, Shieh CC, Lin CF (2012) Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation. *Apoptosis* 17, 1156-1169.

López-Otín C, Bond JS (2008) Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283, 30433-30437.

Lozy F, Karantza V (2012) Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 23, 395-401.

Luciani A, Vilella VR, Esposito S, Brunetti-Pierri N, Medina DL, Settembre C, Gavina M, Raia V, Ballabio A, Maiuri L (2011) Cystic fibrosis: a disorder with defective autophagy. *Autophagy* 7, 104-106.

Luiro K, Yliannala K, Ahtiainen L, Maunu H, Järvelä I, Kyttälä A, Jalanko A (2004) Interconnections of CLN3, Hook1 and Rab proteins link Batten disease to defects in the endocytic pathway. *Hum Mol Genet* 13, 3017-3027.

- Lundmark R, Carlsson SR (2010) Driving membrane curvature in clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *Semin Cell Dev Biol* 21, 363-370.
- Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D, Liu L (2011) Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. *Exp Gerontol* 46, 860-867.
- Lynch-Day MA, Klionsky DJ (2010) The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett* 584, 1359-1366.
- Maiuri MC, Ciriollo A, Kroemer G (2010) Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome. *EMBO J* 29, 515-516.
- Mani A, Gelmann EP (2005) The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol* 23, 4776-4789.
- Marks DL, Bittman R, Pagano RE (2008) Use of Bodipy-labeled sphingolipid and cholesterol analogs to examine membrane microdomains in cells. *Histochem Cell Biol* 130, 819-832.
- Martín de Llano JJ, Andreu EJ, Pastor A, de la Guardia M, Knecht E (2000) Electrothermal atomic absorption spectrometric diagnosis of familial hypercholesterolemia. *Anal Chem* 72, 2406-2413.
- Mattern MR, Wu J, Nicholson B (2012) Ubiquitin-based anticancer therapy: carpet bombing with proteasome inhibitors vs surgical strikes with E1, E2, E3, or DUB inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1823, 2014-2021.
- Mayor S, Pagano RE (2007) Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 603-612.
- McNaught KS, Olanow CW, Halliwell B, Isacson O, Jenner P (2001) Failure of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2, 589-594.
- Meijer AJ, Codogno P (2004) Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2445-2462.
- Meikle PJ, Hopwood JJ, Clague AE, Carey WF (1999) Prevalence of lysosomal storage disorders. *JAMA* 281, 249-254.
- Mercer J, Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11, 510-520.
- Miller J, Gordon C (2005) The regulation of proteasome degradation by multi-ubiquitin chain binding proteins. *FEBS Lett* 579, 3224-3230.

Miller JH Jr, Rajapakshe KI, Infante HL, Claycomb JR (2013) Electric field driven torque in ATP synthase. *PLoS One* 8, e74978.

Min M, Lindon C (2012) Substrate targeting by the ubiquitin-proteasome system in mitosis. *Semin Cell Dev Biol* 23, 482-491.

Miotto G, Venerando R, Marin O, Siliprandi N, Mortimore GE (1994) Inhibition of macroautophagy and proteolysis in the isolated rat hepatocyte by a nontransportable derivative of the multiple antigen peptide Leu8-Lys4-Lys2-Lys-beta Ala. *J Biol Chem* 269, 25348-25353.

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.

Mortimore GE, Pösö AR (1984) Lysosomal pathways in hepatic protein degradation: regulatory role of amino acids. *Fed Proc* 43, 1289-1294.

Moruno F, Pérez-Jiménez E, Knecht E (2012) Regulation of autophagy by glucose in Mammalian cells. *Cells* 1, 372-395.

Moruno F (2013) Regulación de la degradación intracelular de proteínas por glucosa. Tesis doctoral.

Nabi IR (2009) Cavin fever: regulating caveolae. *Nat Cell Biol* 11, 789-791.

Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, Kamimoto T, Nara A, Funao J, Nakata M, Tsuda K, Hamada S, Yoshimori T (2004) Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037-1040.

Nobukuni T, Joaquin M, Roccio M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, Byfield MP, Backer JM, Natt F, Bos JL, Zwartkruis FJ, Thomas G (2005) Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 14238-14243.

Nugent T, Mole SE, Jones DT (2008) The transmembrane topology of Batten disease protein CLN3 determined by consensus computational prediction constrained by experimental data. *FEBS Lett* 582, 1019-1024.

Oinonen C, Rouvinen J (2000) Structural comparison of Ntn-hydrolases. *Protein Sci* 9, 2329-2337.

Okayama H (2012) Cell cycle control by anchorage signaling. *Cell Signal* 24, 1599-1609.

Olazabal IM, Caron E, May RC, Schilling K, Knecht DA, Machesky LM (2002) Rho-kinase and myosin-II control phagocytic cup formation during CR, but not FcγR, phagocytosis. *Curr Biol* 12, 1413-1418.

Orenstein SJ, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* 21, 719-726.

Orlowski M, Wilk S (2000) Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch Biochem Biophys* 383, 1-16.

Orlowski M, Wilk S (2003) Ubiquitin-independent proteolytic functions of the proteasome. *Arch Biochem Biophys* 415, 1-5.

Overholtzer M, Mailleux AA, Mouneimne G, Normand G, Schnitt SJ, King RW, Cibas ES, Brugge JS (2007) A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell* 131, 966-979.

Pal A, Kraetzner R, Gruene T, Grapp M, Schreiber K, Grønborg M, Urlaub H, Becker S, Asif AR, Gärtner J, Sheldrick GM, Steinfeld R (2009) Structure of tripeptidyl-peptidase I provides insight into the molecular basis of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem* 284, 3976-3984.

Palmer A, Rivett AJ, Thomson S, Hendil KB, Butcher GW, Fuertes G, Knecht E (1996) Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. *Biochem J* 316, 401-407.

Palmer DN, Barry LA, Tyynelä J, Cooper JD (2013) NCL disease mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1832, 1882-1893.

Panicker AK, Buhusi M, Erickson A, Maness PF (2006) Endocytosis of beta1 integrins is an early event in migration promoted by the cell adhesion molecule L1. *Exp Cell Res* 312, 299-307.

Park C, Cuervo AM (2013) Selective autophagy: talking with the UPS. *Cell Biochem Biophys* 67, 3-13.

Pearce DA, Ferea T, Nosel SA, Das B, Sherman F (1999) Action of BTN1, the yeast orthologue of the gene mutated in Batten disease. *Nat Genet* 22, 55-58.

Pearce DA, Sherman F (1999) Investigation of Batten Disease with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Metab* 66, 314-319.

Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311-320.

Pérez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Díez-Marqués ML, Canela A, López-Novoa JM, Rodríguez-Puyol M, Blasco MA, Rodríguez-Puyol D (2008)

Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radic Biol Med* 45, 1243-1251.

Persaund-Sawin DA, McNamara JO II, Rylova S, Vandongen A, Boustany RM (2004) A galactosylceramide binding domain is involved in trafficking of CLN3 from Golgi to rafts via recycling endosomes. *Pediatr Res* 56, 449-463.

Pfeffer SR (2009) Multiple routes of protein transport from endosomes to the trans Golgi network. *FEBS Lett* 583, 3811-3816.

Pickart CM (1997) Targeting of substrates to the 26S proteasome. *FASEB J* 11, 1055-1066.

Pickart CM, Cohen RE (2004) Proteasomes and their kin: proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 177-187.

Plotnikov A, Zehorai E, Procaccia S, Seger R (2011) The MAPK cascades: signalling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta* 1813, 1619-1633.

Poët M, Kornak U, Schweizer M, Zdebik AA, Scheel O, Hoelter S, Wurst W, Schmitt A, Fuhrmann JC, Planells-Cases R, Mole SE, Hübner CA, Jentsh TJ (2006) Lysosomal storage disease upon disruption of the neuronal chloride transport protein CLC-6. *Proc Nat Acad Sci USA* 103, 13854-13859.

Proud CG (2002) Regulation of mammalian translation factors by nutrients. *Eur J Biochem* 269, 5338-5349.

Proud CG (2004) mTOR-mediated regulation of translation factors by amino acids. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 429-436.

Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112, 1809-1820.

Rakheja D, Narayan SB, Pastor JV, Bennett MJ (2004) CLN3P, the Batten disease protein, localizes to membrane lipid rafts (detergent-resistant membranes). *Biochem Biophys Res Commun* 317, 988-991.

Ramachandran N, Girard JM, Turnbull J, Minassian BA (2009) The autosomal recessively inherited progressive myoclonus epilepsies and their genes. *Epilepsia* 50 Suppl 5, 29-36.

Ramírez-Montealegre D, Pearce DA (2005) Defective lysosomal arginine transport in juvenile Batten disease. *Hum Mol Genet* 14, 3759-3773.

Ravikumar B, Futter M, Jahreiss L, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC, Menzies FM, Narayanan U, Renna M, Jimenez-Sanchez M, Sarkar S, Underwood B, Winslow A, Rubinsztein DC (2009) Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci* 122, 1707-1711.

Rawlings ND, Barrett AJ (1999) Tripeptidyl-peptidase I is apparently the CLN2 protein absent in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Biochim Biophys Acta* 1429, 496-500.

Rechsteiner M, Hill CP (2005) Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol* 15, 27-33.

Reggiori F, Klionsky DJ (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* 1, 11-21.

Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electro-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17, 208-212.

Rivett AJ (1993) Proteasomes: multicatalytic proteinase complexes. *Biochem J* 291, 1-10.

Robinson MS, Bonifacino JS (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13, 444-453.

Rodríguez-Muela N, Koga H, García-Ledo L, de la Villa P, de la Rosa EJ, Cuervo AM, Boya P (2013) Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell* 12, 478-488.

Rojas R, Kametaka S, Haft CR, Bonifacino JS (2007) Interchangeable but essential functions of SNX1 and SNX2 in the association of retromer with endosomes and the trafficking of mannose 6-phosphate receptors. *Mol Cell Biol* 27, 1112-1124.

Rojas R, van Vlijmen T, Mardones GA, Prabhu Y, Rojas AL, Mohammed S, Heck AJ, Raposo G, van der Sluijs P, Bonifacino JS (2008) Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol* 183, 513-526.

Roskoski R Jr (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66, 105-143.

Rylova SN, Amalfitano A, Persaud-Sawin DA, Guo WX, Chang J, Jansen PJ, Proia AD, Boustany RM (2002) The CLN3 gene is a novel molecular target for cancer drug discovery. *Cancer Res* 62, 801-808.

Saftig P, Klumperman J (2009) Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 623-635.

Saftig P, Schröder B, Blanz J (2010) Lysosomal membrane proteins: life between acid and neutral conditions. *Biochem Soc Trans* 38, 1420-1423.

Salvador N, Aguado C, Horst M, Knecht E (2000) Import of a cytosolic protein into lysosomes by chaperone-mediated autophagy depends on its folding state. *J Biol Chem* 275, 27447-27456.

Sancak Y, Bar-Peled L, Zoncu R, Markhard AL, Nada S, Sabatini DM (2010) Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290-303.

Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C (2014). Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. *Stem Cell Res* 12, 119-131.

Schmiedt ML, Blom T, Blom T, Kopra O, Wong A, von Schantz-Fant C, Ikonen E, Kuronen M, Jauhainen M, Cooper JD, Jalanko A (2012) Cln5-deficiency in mice leads to microglial activation, defective myelination and changes in lipid metabolism. *Neurobiol Dis* 46, 19-29.

Schnitzer JE, Liu J, Oh P (1995) Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J Biol Chem* 270, 14399-14404.

Schultz ML, Tecedor L, Chang M, Davidson BL (2011) Clarifying lysosomal storage diseases. *Trends Neurosci* 34, 401-410.

Seaman MN (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J Cell Biol* 165, 111-122.

Seglen PO, Gordon PB (1984) Amino acid control of autophagic sequestration and protein degradation in isolated rat hepatocytes. *J Cell Biol* 99, 435-444.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM (2010) Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell* 40, 10-22.

Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A (2008) A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet* 17, 119-129.

Shamsi FA, Boulton M (2001) Inhibition of RPE lysosomal and antioxidant activity by the age pigment lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3041-3046.

Shanab AY, Nakazawa T, Ryu M, Tanaka Y, Himori N, Taguchi K, Yasuda M, Watanabe R, Takano J, Saïdo T, Minegishi N, Miyata T, Abe T, Yamamoto M (2012) Metabolic stress response implicated in diabetic retinopathy: the role of calpain, and the therapeutic impact of calpain inhibitor. *Neurobiol Dis* 48, 556-567.

Sigismund S, Argenzio E, Tosoni D, Cavallaro E, Polo S, Di Fiore PP (2008) Clathrin-mediated internalization is essential for sustained EGFR signaling but dispensable for degradation. *Dev Cell* 15, 209-219.

Siintola E, Lehesjoki A, Mole SE (2006) Molecular genetics of the NCL – status and perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1762, 857-864.

Siintola E, Partanen S, Strömme P, Haapanen A, Haltia M, Maehlen J, Lehesjoki AE, Tyyneä J (2009) Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis. *Brain* 129,1438-1445.

Sleat DE, Gin RM, Sohar I, Wisniewski K, Sklower-Brooks S, Pullarkat RK, Palmer DN, Lerner TJ, Boustany RM, Uldall P, Siakotos AN, Donnelly RJ, Lobel P (1999) Mutational analysis of the defective protease in classic late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, a neurodegenerative lysosomal storage disorder. *Am J Hum Genet* 64, 1511-1523.

Smith KR, Dahl HH, Canafoglia L, Andermann E, Damiano J, Morbin M, Bruni AC, Giaccone G, Cossette P, Saftig P, Grötzinger J, Schwake M, Andermann F, Staropoli JF, Sims KB, Mole SE, Franceschetti S, Alexander NA, Cooper JD, Chapman HA, Carpenter S, Berkovic SF, Bahlo M (2013) Cathepsin F mutations cause Type B Kufs disease, an adult-onset neuronal ceroid lipofuscinosis. *Hum Mol Genet* 22, 1417-1423.

Sobolewska A, Motyl T, Gajewska M (2011) Role and regulation of autophagy in the development of acinar structures formed by bovine BME-UV1 mammary epithelial cells. *Eur J Cell Biol* 90, 854-864.

Son YO, Wang X, Hitron JA, Zhang Z, Cheng S, Budhரா A, Ding S, Lee JC, Shi X (2011) Cadmium induces autophagy through ROS-dependent activation of the LKB1-AMPK signaling in skin epidermal cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 255, 287-296.

Staropoli JF, Karaa A, Lim ET, Kirby A, Elbalalesy N, Romansky SG, Leydiker KB, Coppel SH, Barone R, Xin W, MacDonald ME, Abdenur JE, Daly MJ, Sims KB, Cotman SL (2012) A homozygous mutation in KCTD7

links neuronal ceroid lipofuscinosis to the ubiquitin-proteasome system. *Am J Hum Genet* 91, 202-208.

Steenhuis P, Froemming J, Reinheckel T, Storch S (2012) Proteolytic cleavage of the disease-related lysosomal membrane glycoprotein CLN7. *Biochim Biophys Acta* 1822, 1617-1628.

Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, He C, Pan H (2014) p38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. *Cancer Lett* 344, 174-179.

Suraweera A, Münch C, Hanssum A, Bertolotti A (2012) Failure of amino acid homeostasis causes cell death following proteasome inhibition. *Mol Cell* 48, 242-253.

Swanson JA (2008) Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 639-649.

Taherbhoy AM, Tait SW, Kaiser SE, Williams AH, Deng A, Nourse A, Hammel M, Kurinov I, Rock CO, Green DR, Schulman BA (2011) Atg8 transfer from Atg7 to Atg3: a distinctive E1-E2 architecture and mechanism in the autophagy pathway. *Mol Cell* 44, 451-461.

Tammen I, Houweling J, Frugier T, Mitchell NL, Kay GW, Cavanagh JA, Cook RW, Raadsma HW, Palmer DN (2006) A missense mutation (c.184C>T) in ovine CLN6 causes neuronal ceroid lipofuscinosis in Merino sheep whereas affected South Hampshire sheep have reduced levels of CLN6 mRNA. *Biochim Biophys Acta* 1762, 898-905.

Tanaka K, Mizushima T, Saeki Y (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem* 393, 217-234.

Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, von Figura K, Saftig P (2000) Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-906.

Tanida I, Ueno T, Kominami E (2004) LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 2503-2518.

Tanida I, Minematsu-Ikeguchi, Ueno T, Kominami E (2005) Lysosomal Turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy* 1, 84-91.

Tardy C, Codogno P, Autefage H, Levade T, Andrieu-Abadie N (2006) Lysosomes and lysosomal proteins in cancer cell death (new players of an old struggle). *Biochim Biophys Acta* 1765, 101-125.

Tesseraud S, Métayer S, Duchêne S, Bigot K, Grizard J, Dupont J (2007) Regulation of protein metabolism by insulin: value of different approaches and animal models. *Dom Anim Endocrinol* 33, 123-142.

Tokunaga C, Yoshino K, Yonezawa K (2004) mTOR integrates amino acid and energy-sensing pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 443-446.

Tremblay F, Marette A (2001) Amino acid and insulin signaling via the mTOR/P70S6 kinase pathway. *J Biol Chem* 276, 38052-38060.

Utskarpen A, Slagsvold HH, Dyve AB, Skanland SS, Sandvig K (2007) SNX1 and SNX2 mediate retrograde transport of Shiga toxin. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 566-570.

Uusi-Rauva K, Liiro K, Tanhuanpää K, Kopra O, Martín-Vasallo P, Kyttälä A, Jalanko A (2008) Novel interactions of CLN3 protein link Batten disease to dysregulation of fodrin-Na⁺, K⁺ ATPase complex. *Exp Cell Res* 314, 2895-905.

Uusi-Rauva K, Kyttälä A, van der Kant R, Vesa J, Tanhuanpää K, Neefjes J, Olkkonen VM, Jalanko A (2012) Neuronal ceroid lipofuscinosis protein CLN3 interacts with motor proteins and modifies location of late endosomal compartments. *Cell Mol Life Sci* 69, 2075-2089.

Vázquez CL, Colombo MI (2009) Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. *Methods Enzymol* 452, 85-95.

Vellai T, Takacs-Vellai K, Zhang Y, Kovacs AL, Orosz L, Müller F (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* 426, 620.

Vergés M (2007) Retromer and sorting nexins in development. *Front Biosci* 12, 3825-3851.

Vergés M (2008) Retromer: multipurpose sorting and specialization in polarized transport. *Int Rev Cell Mol Biol* 271, 153-198.

Villarroya D (2002) Bases moleculares de las lipofuscinosis ceroides neuronales. Tesis doctoral.

Vines DJ, Warburton MJ (1999) Classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis fibroblasts are deficient in lysosomal tripeptidyl peptidase I. *FEBS Lett* 443, 131-135.

Vitner EB, Platt FM, Futerman AH (2010) Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem* 285, 20423-20427.

von Schantz C, Kielar C, Hansen SN, Pontikis CC, Alexander NA, Kopra O, Jalanko A, Cooper JD (2009) Progressive thalamocortical neuron loss in Cln5 deficient mice: Distinct effects in Finnish variant late infantile NCL. *Neurobiol Dis* 34, 308-319.

Wang J, Maldonado MA (2006) The ubiquitin-proteasome system and its role in inflammatory and autoimmune diseases. *Cell Mol Immunol* 3, 255-261.

Wang RC, Levine B (2010) Autophagy in cellular growth. *FEBS Lett* 584, 1417-1426.

Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2013) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1240-1247.

Wassmer T, Attar N, Bujny MV, Oakley J, Traer CJ, Cullen PJ (2007) A loss-of-function screen reveals SNX5 and SNX6 as potential components of the mammalian retromer. *J Cell Sci* 120, 45-54.

Webb AE, Brunet A (2014) FOXO transcription factors: key regulators of cellular quality control. *Trends Biochem Sci* 39, 159-169.

Wong E, Cuervo AM (2010) Integration of clearance mechanisms: the proteasome and autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a006734.

Wu D, Cederbaum AI (2013) Inhibition of autophagy promotes CYP2E1-dependent toxicity in HepG2 cells via elevated oxidative stress, mitochondria dysfunction and activation of p38 and JNK MAPK. *Redox Biol* 1, 552-565.

Wujek P, Kida E, Walus M, Wisniewski KE, Golabek AA (2004) N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. *J Biol Chem* 279, 12827-12839.

Yan J, Feng Z, Liu J, Shen W, Wang Y, Wertz K, Weber P, Long J, Liu J (2012) Enhanced autophagy plays a cardinal role in mitochondrial dysfunction in type 2 diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats: ameliorating effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate. *J Nutr Biochem* 23, 716-724.

Yan MH, Wang X, Zhu X (2013) Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. *Free Radic Biol Med* 62, 90-101.

Yang Z, Klionsky DJ (2010) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 12, 814-822.

Yasukawa T, Tokunaga E, Ota H, Sugita H, Martyn JA, Kaneki M (2005) S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance. *J Biol Chem* 280, 7511-7518.

Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12, 1542-1552.

Yoshizawa F (2004) Regulation of protein synthesis by branched-chain amino acids in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 313, 417-422.

Yoshikawa M, Uchida S, Ezaki J, Rai T, Hayama A, Kobayashi K, Kida Y, Noda M, Koike M, Uchiyama Y, Marumo F, Kominami E, Sasaki S (2002) CLC-3 deficiency leads to phenotypes similar to human neuronal ceroid lipofuscinosis. *Genes Cells* 7, 597-605.

Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee JH, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA (2005) Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 171, 87-98.

Yuan J, Lipinski M, Degtarev A (2003) Diversity in the mechanisms of neuronal cell death. *Neuron* 40, 401-413.

Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K (2009) The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1793, 1496-1507.

Zhou S, Zhao L, Kuang M, Zhang B, Liang Z, Yi T, Wei Y, Zhao X (2012) Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? *Cancer Lett* 323, 115-127.

Zhu X, Wang K, Zhang K, Zhu L, Zhou F (2014) Ziyuglycoside II induces cell cycle arrest and apoptosis through activation of ROS/JNK pathway in human breast cancer cells. *Toxicol Lett* 227, 65-73

